



Etude des mécanismes régulateurs des cellules NK : rôle de la molécule PD-1 et de la prostaglandine E2 (PGE2)

Asma Beldi-Ferchiou

► To cite this version:

Asma Beldi-Ferchiou. Etude des mécanismes régulateurs des cellules NK : rôle de la molécule PD-1 et de la prostaglandine E2 (PGE2). Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T042 . tel-01127473

HAL Id: tel-01127473

<https://theses.hal.science/tel-01127473>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Discipline : IMMUNOLOGIE

École Doctorale : GC2ID

Présenté et soutenue publiquement par

Par Asma Beldi-Ferchiou

Le 20 novembre 2014

**Sujet : Etude des mécanismes régulateurs des cellules NK : rôle de la
molécule PD-1 et de la prostaglandine E2 (PGE2)**

Jury

Pr Christian Boitard

Pr Sophie Caillat-Zucman

Dr Vincent Vieillard

Dr Anne Caignard

Pr Sophie Hüe

Pr Claire Hivroz

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

SOMMAIRE

Résumé	page 6
Astract	page 7
Abréviations	page 8
Introduction	page 10
 Partie I : Les cellules Natural Killer (NK)	 page 12
1 Développement des cellules NK	page13
1.1 Génération et stades de développement des cellules NK chez l'homme	page13
1.2 Génération des cellules NK en dehors de la moelle osseuse chez l'homme.....	page19
 2 Le répertoire NK.....	 page19
2.1 Les récepteurs reconnaissant le CMH-I	page20
2.2 Les récepteurs activateurs de la famille des NCR	page 22
2.3 Le récepteur NKG2D (Natural-Killer group 2 D).....	page
24	
2. 4 DNAM-1.....	page 25
2. 6 CD161.....	page 25
2. 6 Autres récepteurs activateurs.....	page 25
 3 Education des cellules NK : activation et tolérance au soi	 page 27
3. 1 Les premières modèles de l'éducation des cellules NK	page 27
3. 2 Les modèles actuels de l'éducation des cellules NK : le « Licencing ».....	page 28
 4 Les fonctions effectrices des cellules NK.....	 page 29
4. 1 Les fonctions cytotoxiques des cellules NK	page 30
4. 2 Régulation de la réponse immune par les cellules NK	page 31
4. 3 Les cellules NK utérines (uNK)	page 34
 5 Mécanismes d'échappement à la réponse immune NK	 page 34
5. 1 Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse NK	page 34
5. 2 Mécanismes d'échappement viral à la réponse NK.....	page 36
5. 3 La molécule PD-1 : nouveau mécanisme d'échappement à la réponse NK ?...	page 37

PARTIE II: PROGRAMMED-DEATH ONE	page 39
1 Structure et expression du récepteur PD-1	page 40
2 Les ligands de PD-1	page 43
3 Voie de signalisation de la molécule PD-1	page 46
4 Rôle physiologiques et pathologiques de PD-1	page 50
4 .1 Rôle physiologique de PD-1 dans le maintien de la tolérance immune	page 51
4 .2 PD-1 et maladies auto-immunes	page 55
4 .3 PD-1 et infections virales	page 57
4 .4 PD-1 et pathologies néoplasiques	page 60
 OBJECTIFS DU TRAVAIL	 page 63
RESULTATS	page 66
 ETUDE 1 : EXPRESSION DE PD-1 SUR LES CELLULES NK : CONSEQUENCES PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES	 page 67
 ETUDE II : PROSTAGLANDINE E2 (PGE2) : UN REGULATEUR NEGATIF AUTOCHRINE ET PARACRINE DE L'ACTIVATION IL-15 DEPENDANTE DES CELLULES NK ?	 page 101
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	 page 124
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 page 133

RÉSUMÉ

Les cellules Natural Killer (NK) sont des effecteurs de l'immunité innée et constituent de véritables sentinelles dans l'immuno-surveillance contre les virus et les processus tumoraux. Pour échapper à la reconnaissance NK, les virus ainsi que les cellules tumorales utilisent de nombreux subterfuges. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux facteurs régulateurs de la fonction des cellules NK, la molécule PD-1 et la prostaglandine E2 (PGE2). Programmed death 1 (PD-1) est une molécule régulatrice exprimée sur les lymphocytes T et B activés. L'engagement de PD-1 par ses ligands inhibe leurs fonctions effectrices et prolifératives. Au cours de certaines infections virales chroniques ou de tumeurs, l'expression de PD-1 est associée à l'épuisement fonctionnel des lymphocytes T effecteurs. Le blocage de l'axe PD-1/PD-1 ligands restaure les fonctions effectrices des lymphocytes et représente ainsi une approche thérapeutique prometteuse.

Nous avons mis en évidence de manière fortuite une expression inhabituelle du récepteur PD-1 sur les cellules NK au cours de certaines infections virales chroniques (HHV8, VIH ou VHC). L'expression de PD-1 sur les cellules NK caractérise une population récemment activée (CD69++, CD25 + et Nkp44 +), susceptible à l'apoptose (Annexin V+), exprimant une moindre quantité du récepteur de cytotoxicité naturelle NKp46. L'analyse fonctionnelle montre que les cellules NK PD-1+ ont des capacités de cytotoxicité (dégranulation CD107a) et de production de cytokines (IFN γ) réduites en comparaison avec leurs homologues PD-1-. De façon intéressante, l'IL-2 et l'IL-15 peuvent restaurer les fonctions effectrices des cellules NK PD-1+. Contrairement aux cellules T dont l'expression de PD-1 est induite par divers stimuli, seule la stimulation des récepteurs NKp46 et NKp30, en synergie avec l'action de l'IL-15 ou l'IL-2, induit in vitro de façon reproductible l'expression de PD-1 sur les cellules NK de témoins sains. Pour pouvoir disposer d'un modèle in vitro de cellules NK PD-1+, nous avons généré des cellules exprimant PD-1 de manière stable par transduction lentivirale de la lignée NKL. En comparaison avec les cellules transduites par le vecteur vide, les cellules NKL PD-1+ ont des capacités cytotoxiques réduites, confirmant nos résultats chez les patients.

Nous avons aussi étudié les mécanismes par lesquels la PGE2, une autre molécule immuno-modulatrice, régule les fonctions des cellules NK. Nos résultats suggèrent que la PGE2 agit à travers ses récepteurs EP2 et EP4 pour inhiber l'expression de NKG2D et de l'IL-15R γ induite par l'IL-15 sur les cellules NK. Ce travail doit nous permettre de mieux comprendre comment la PGE2 s'oppose aux effets activateurs de l'IL-15 sur les cellules NK, et représente un mécanisme de rétrocontrôle de l'inflammation.

En conclusion, nos résultats montrent que l'expression de PD-1 sur les cellules NK représente un mécanisme supplémentaire d'échappement viral à la réponse immune. La suite de l'étude sur la PGE2 devrait nous permettre d'évaluer l'intérêt de l'utilisation d'antagonistes spécifiques dans l'immunothérapie anti-tumorale par l'IL-15. Le lien entre la PGE2 et l'expression de PD-1 sur les cellules NK est en cours d'investigation.

ABSTRACT

Natural Killer (NK) cells are effectors of the innate immune system, and play a crucial role in virus and cancer immunosurveillance. To escape NK-cell mediated elimination of infected or transformed cells, viruses and tumors have developed multiple strategies to interfere with NK-cell functions. In the present study, we investigated the role of two regulatory molecules, Programmed Death-1 (PD-1) and Prostaglandine E2 (PGE2), in controlling NK cell activation and effector functions.

PD-1 is a key immune checkpoint receptor expressed by activated T and B lymphocytes. Upon interaction with its cognate ligands, PD-1 inhibits lymphocyte proliferation and functions. During cancer or chronic viral infections, PD-1 expression is associated with functional exhaustion of effector T cells. Blockade of PD-1 signaling restores T-cell functions, and represents a promising therapeutic tool.

We fortuitously observed unusual expression of PD-1 on a subset of CD56dim NK cells in some patients with persistent viral infection (HHV8, HIV or HCV). We show that PD-1 expression on NK cells characterizes a subpopulation of recently activated cells (CD69+, CD25+, Nkp44+) that are sensitive to apoptosis (Annexin V+) and not senescent (CD57-). NKp46 expression was also markedly decreased on PD-1+ NK cells. In vitro functional experiments showed that PD-1+ NK cells had impaired cytotoxic capacity (CD107a degranulation) and reduced IFN- γ production compared to their PD-1- counterpart, suggesting that they might represent functionally exhausted NK cells. Interestingly, exogenous IL-2 and IL-15 could restore PD-1+ NK cell effector functions. While strong non-specific stimulation by PMA/ionomycin transiently induced PD-1 on control NK cells, only activation through NKp46 or NKp30 receptors in the presence of IL-15 could reproducibly induce stable PD-1 expression. To investigate the effect of PD-1 expression on NK cells in the absence of any confounding factor related to the underlying disease, we generated NK cells stably expressing PD-1 after lentiviral transduction. Compared to NK cells transduced with the control vector, PD-1+ cells showed a constitutively decreased CD107a degranulation, thus confirming our findings in NK cells from infected patients.

In the second part of this study, we investigated the immunosuppressive role of PGE2 in the control of IL-15-mediated NK cell activation. Our results suggest that PGE2 acts through EP2 and EP4 receptors to inhibit IL-15 induced NKG2D and IL-15R γ expression on NK cells. These findings allow a better comprehension of PGE2/IL-15 antagonism in the regulation of NK cell responses.

In conclusion, our results indicate that PD-1 expression on NK cells could represent a supplementary mechanism of immune evasion strategy, and allow introducing the concept of exhausted NK cells, similar to exhausted PD-1+ T cells. Our results also demonstrate that PGE2 exerts a negative feedback on IL-15-mediated effects on NK cells. Blocking PGE2 or its receptors could be of interest in IL-15 tumor immunotherapy to potentiate IL-15-induced cytotoxic functions of NK cells.

ABREVIATIONS

ADCC: Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity

BCR: B Cell Receptor

CMH I: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I

CMV : Cytomégalo-virus

COX-1 : Cyclo-oxygénase 1

COX-2 : Cyclo-oxygénase 2

CTLA-4 : Cytotoxique T Lymphocyte Antigen 4

DNAM-1: DNAX Accessory Molecule-1

EBV: Epstein Barr Virus

GM-CSF: Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor

HHV8: Human Herpes Virus 8

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

ITSM: Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif

KIR: Killer Cell Immunoglobuline-Like Receptor

KS: Sarcome de Kaposi

KSHV: Kaposi Sarcoma associated Herpes Virus

LCMV: Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire

MCMV: Murine Cytomegalovirus

MICA/B: Major histocompatibility Complex class I-related Chain A and B

NCR: Natural Cytotoxicity Receptor

NK: Natural Killer

NKG2: Natural Killer Gene du groupe 2

NKT: Natural Killer T cell

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PD-1: Programmed Death-1

PD-L: Programmed Death-1 Ligand

PGE2: Prostaglandine E2

PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

SH1: Src Homology 1

SH2: Src Homology 2

TCR: T Cell Receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

Treg: Lymphocytes T régulateurs

ULBP: UL-16 binding proteins

VEGE: Vascular Endothelial Growth Factor

VHB: Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

PARTIE I: LES CELLULES NATURAL KILLER (NK)

PARTIE I : LES CELLULES NATURAL KILLER (NK)

Les cellules NK ont été co-découvertes au début des années 70 par Rolf Kiessling et Ronald Herberman en tant que cellules lymphocytaires non B et non T ayant une cytotoxicité naturelle vis-à-vis des cellules tumorales [1, 2]. Contrairement aux lymphocytes T ou B, les NK sont des effecteurs de l'immunité innée et ne nécessitent pas une étape de stimulation préalable ou « priming » pour assurer leurs fonctions. Elles constituent ainsi une première ligne de défense rapidement mobilisable et assurent un rôle important dans l'immuno-surveillance contre les infections virales et les processus tumoraux. Les cellules NK n'ont pas de récepteurs spécifiques pour l'antigène obtenu par réarrangement génique comme le « B cell receptor » (BCR) ou le « T cell receptor » (TCR), en revanche, elles possèdent un large éventail de récepteurs inhibiteurs ou activateurs qui ont pour fonction de différencier le « soi » du « non soi » (ou soi altéré) et de reconnaître différents signaux de danger. L'intégration de tous les signaux reçus à travers ces récepteurs détermine la réponse des cellules NK.

Bien qu'effecteurs de l'immunité innée, les cellules NK participent à la régulation de l'immunité adaptative à travers la sécrétion de cytokines et aussi à travers leur capacité à « dialoguer » et à interagir avec d'autres cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes T [3, 4]. Les cellules NK assurent également d'autres fonctions importantes en transplantation d'organes et greffe de cellules souches hématopoïétiques, ainsi qu'en reproduction [3, 5-7].

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux et représentent chez l'homme entre 2 et 20% des lymphocytes périphériques circulants. Leur distribution tissulaire est assez large et on les retrouve au sein de plusieurs organes lymphoïdes ou non lymphoïdes. Leur développement se déroule principalement au sein de la moelle osseuse, mais plusieurs travaux montrent que d'autres organes peuvent être des sites anatomiques potentiels de développement et de maturation de cellules NK à partir de précurseurs hématopoïétiques.

Chez l'homme, pour discriminer les cellules NK circulantes des autres populations lymphocytaires, on les définit généralement par l'expression membranaire de la molécule CD56 et l'absence de la molécule CD3 (CD56⁺CD3⁻). Mais cette définition minimaliste ne permet

pas de bien distinguer toutes les différentes sous populations NK. L'utilisation d'autres marqueurs est souvent nécessaire pour une étude plus fine et plus exhaustive.

1. Développement des cellules NK

1.1.Génération et stades de développement des cellules NK chez l'homme

Le développement des cellules NK humaines n'est pas encore complètement compris. Néanmoins, les modèles murins ainsi que les données obtenues *in vitro* sur les cellules souches hématopoïétiques humaine et *in vivo* lors des monitorages de la reconstitution NK après greffe de moelle osseuse, ont beaucoup contribué à la compréhension de ce processus. Chez l'homme, les cellules NK se développent à partir d'un progéniteur hématopoïétique CD34⁺ commun aux lymphocytes T et B. A travers la perte et l'acquisition séquentielles de certains marqueurs, ce précurseur s'engage dans la lignée NK puis acquiert progressivement les fonctions et le phénotype des cellules NK matures. Un modèle de développement et de différenciation des cellules NK a été proposé par Freud et Caligiuri (figure 1) [8, 9]. Il comporte cinq stades de différenciation basés sur l'étude de l'expression séquentielle des molécules CD34 (molécule d'adhésion exprimée sur les cellules souches), CD117 (C-kit receptor), CD94, CD16 (Fc gamma RIII) et CD56: stade 1/ pro-NK, stade 2/ pré-NK, stade 3/ iNK (NK immature) et en fin les stades 4 et 5 marqués par l'acquisition de CD56 et correspondant aux NK CD56^{bright} et NK CD56^{dim} respectivement. Un sixième stade de développement peut être proposé et correspondrait aux cellules « NK mémoire » (figure 1) [9]. Cette entité cellulaire et ce concept sont sujets à controverse [10]. Cependant, plusieurs travaux récents appuient la capacité des cellules NK à acquérir des fonctions mémoires [11, 12].

D'une manière schématique, l'engagement dans la lignée NK se fait progressivement jusqu'au stade 3/ iNK. La maturation fonctionnelle et l'expression du répertoire NK se font d'une manière progressive et ordonnée au cours des stades tardifs de leur développement (entre le stade 3 et 5) [8]. Ainsi, le CD161 apparaît en premier, suivi du CD56, CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D, et enfin les récepteurs KIRs et le CD16 [13-15]. L'expression de certains récepteurs, tels que CD56 ou le CD94/NKG2A, diminue au cours du stade final du développement NK. L'acquisition de fonctions effectrices telles que la production d'interféron gamma (IFN- γ) et la

cytotoxicité constitue un événement assez tardif dans le développement des cellules NK et s'effectue entre le stade 4 et 5 [8].

Le site principal de développement des cellules NK est la moelle osseuse, cependant d'autres site anatomiques tels que les organes lymphoïdes secondaires peuvent éventuellement supporter le développement et la maturation des cellules NK [8, 13, 16].

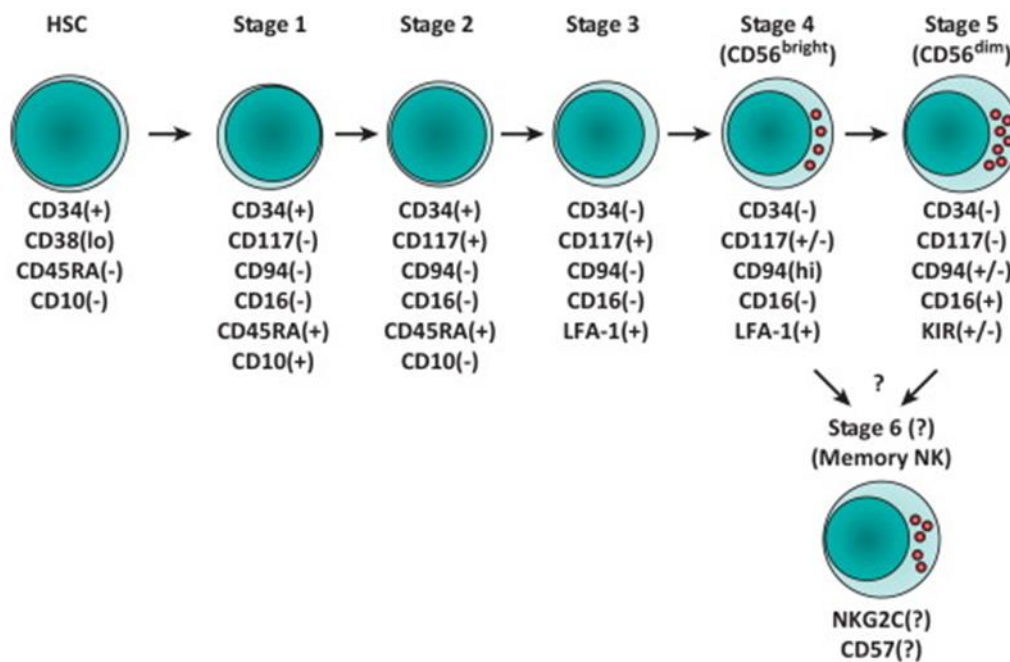


Figure 1. Modèle de développement *in vivo* des cellules NK humaines. Cette figure illustre les différents stades supposés de développement et de maturation des cellules NK humaines à partir d'une cellule souche hématopoïétique [9].

Stade 1 : les pro-NK

Les pro-NK proviennent de progéniteurs hématopoïétiques qui sont CD34+. Outre la forte expression du CD34, les cellules pro-NK expriment aussi CD10 et CD45RA mais pas CD94, CD117 ou CD16 (figure 1). Le CD122 (chaîne β commune des récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15) n'est pas encore exprimé à ce stade du développement (ni au niveau de l'ARNm ni au niveau protéique), et par conséquent les pro-NK ne répondent pas à l'IL-15. Dans la moelle osseuse, le ligand de Flt3 et le c-kit ligand semblent favoriser le développement des cellules CD34+ répondeuses à l'IL-15/IL-2 à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34+ humains [17]. Les

cellules pro-NK sont également présentes au niveau des tissus lymphoïdes secondaires et peuvent aussi acquérir *in vitro* une réactivité à l'IL-15 sous l'action conjointe de flt3 ligand, l'IL-3 et l'IL-7. La réponse à l'IL-15 permet ainsi aux cellules pro-NK de se différencier en pré-NK et ultérieurement en cellules NK [8].

Stade 2 : les pré-NK

Ce stade est caractérisé par l'acquisition du CD117 (c-kit) et la diminution conjointe de l'expression du CD34 (figure 1). Fait important, l'expression du CD122 commence à être détectée au niveau de l'ARNm, alors que la protéine elle-même n'est détectée en surface par Cytométrie en Flux qu'à partir du stade 4 du développement [8, 9]. L'acquisition de l'expression du CD122 marque une étape cruciale et nécessaire pour le bon déroulement du développement des cellules NK. A partir de ce stade pré-NK, ces précurseurs répondent à l'effet de l'IL-15 pour pouvoir ainsi, sous son influence, se différencier en cellules NK matures [13, 18]. Le rôle de l'IL-15 dans le développement des cellules NK semble être central. En effet, chez les souris déficiente pour l'IL-15 ou pour l'un des composants de sa voie de signalisation, le développement des cellules NK est profondément perturbé [19, 20].

Stade 3 : les cellules NK immature ou iNK

Ce stade correspondrait à un point de non-retour du développement NK: la cellule serait définitivement engagée dans la lignée NK et perdrait toute capacité à s'engager dans la lignée T ou des cellules dendritiques [8, 13]. Cependant, au niveau des tissus lymphoïdes secondaires, ce stade est hétérogène et seule une fraction s'engage dans la lignée NK [9]. Ce stade est également caractérisé par l'acquisition de certains marqueurs retrouvés au niveau des cellules NK matures telles que le CD161, alors que l'expression des récepteurs hétérodimériques CD94/NKG2, NKp46, NKG2D, CD16 et les KIR n'est pas encore acquise [8]. Le stade 3/iNK constitue donc une étape de transition entre la fin du processus d'engagement des précurseurs hématopoïétiques dans la lignée NK et le début du processus de maturation des cellules NK proprement dites.

Stade 4 et 5: Les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim}

Au niveau du sang périphérique on distingue deux sous-populations NK en fonction de l'intensité d'expression de la molécule CD56 : les cellules CD56^{bright} (stade 4) et les cellules NK CD56^{dim} (stade 5) [21]. La progression vers le stade 4 est marquée par la diminution de l'expression du CD117 et du CD127 et l'acquisition de l'expression des récepteurs CD94/NKG2A, NKG2D, NKp46, ainsi que le CD122 qui devient détectable au niveau protéique par cytométrie en flux [8]. Les cellules NK CD56^{bright} expriment très faiblement les récepteurs KIR et le CD16 et sont peu fournies en granules de perforine. Ce phénotype se traduit sur le plan fonctionnel par de faibles capacités cytotoxiques. Par contre, les cellules NK CD56^{bright} activées sont capables de sécréter de nombreuses cytokines et en particulier de grandes quantités d'IFN- γ . Ainsi, elles jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immune [8, 21-23]. Récemment, une population de cellules NK matures CD56^{bright}CD16+ a été décrite au niveau des ganglions métastatiques au cours du mélanome. De façon intéressante, cette sous population NK est dotée d'un haut potentiel lytique, et tue efficacement les cellules tumorales suite à l'activation par l'IL-2 ou l'IL-15 [24]. En périphérie, les NK CD56^{bright} ne représentent que 10% des cellules NK circulantes alors qu'elles représentent 90% des cellules NK des ganglions lymphatiques [25, 26].

Contrairement aux cellules NKCD56^{bright}, les cellules NKCD56^{dim} représentent 90% des cellules NK du sang périphérique. Elles expriment fortement le CD16, les récepteurs KIR et contiennent de façon constitutive une quantité abondante de granules de perforine et de granzymes. Ainsi, sur le plan fonctionnel et de manière opposée aux cellules NKCD56^{bright}, les NKCD56^{dim} ont un haut potentiel cytotoxique mais produiraient moins de cytokines [23].

Plusieurs données expérimentales suggèrent que les cellules NK CD56^{dim} dérivent des NK CD56^{bright}. En effet, contrairement aux NK CD56^{dim}, les cellules NK CD56^{bright} expriment encore le CD117 (c-kit) qui pourrait être considéré comme marqueur d'immaturité exprimé sur les précurseurs hématopoïétiques (figure 1) [27]. *In vitro*, la culture de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ en présence de l'IL-15 aboutit essentiellement à la génération de cellules NK CD56^{bright}CD16- [18]. Le monitoring *in vivo* de la reconstitution des cellules NK après greffe de cellules souches hématopoïétiques, montre qu'après la prise de la greffe, les NK CD56^{bright} dérivées du donneur apparaissent en premier dans le sang du receveur, tandis que les cellules NK CD56^{dim} apparaissent plus tardivement [28]. En périphérie les cellules NK CD56^{dim} possèdent des télomères plus courts que les cellules NK CD56^{bright}, suggérant que les cellules NK CD56^{dim} ont subi des cycles de divisions supplémentaires et qu'elles seraient ainsi plus

matures que CD56^{bright} [29]. La trans-présentation de l'IL-15 promeut *in vivo* le développement des cellules NK CD56^{bright} ainsi que leur différenciation progressive en cellules NK CD56^{dim} [30]. En fin, des travaux récents montrent que les cellules CD56^{bright}CD16⁺ constituent une étape de développement intermédiaire entre les NK CD56^{bright} et les NK CD56^{dim} [31]. Toutes ces données confortent l'hypothèse que les cellules NK CD56^{dim} dérivent des NK CD56^{bright} mais les preuves formelles manquent, surtout que l'activation des NK CD56^{dim} peut aboutir à un phénotype CD56^{bright} avec diminution de l'expression du CD16 [32].

La figure 2 résume les principales différences phénotypiques et fonctionnelles entre les cellules NK CD56^{dim} et NK CD56^{bright}.

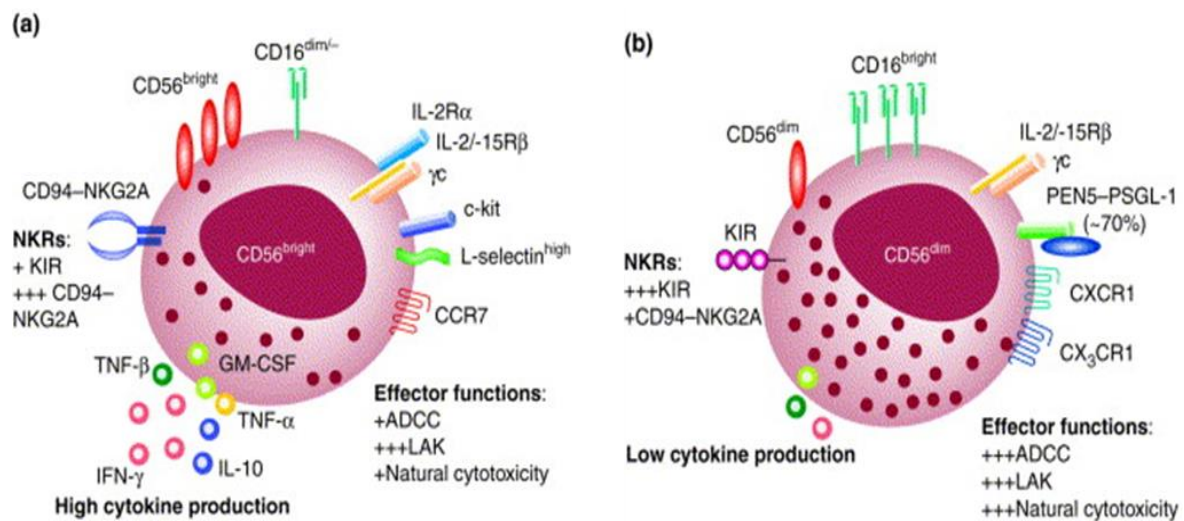


Figure 2. Phénotype et fonctions des cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} [21].

Stade 6: Les cellules NK mémoires

Le compartiment immunitaire inné est supposé être dépourvu de réponses spécifiques à l'antigène et incapable de développer des réponses mémoires. Cependant, même si les cellules NK sont encore aujourd'hui catégorisées comme faisant partie du système immunitaire inné, il existe une accumulation récente de plusieurs données expérimentales suggérant qu'elles peuvent se différencier en cellules mémoires à longue durée de vie, avec une réponse secondaire

spécifique amplifiée [11, 33, 34]. Trois modèles possibles conduiraient à la génération des cellules NK « mémoires » (figure 3) [12]: 1) la reconnaissance « spécifique » de la protéine m157 par le récepteur NK murin Ly49H au cours de l'infection par le cytomégalo virus murin MCMV, 2) la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, en fin 3) la génération d'une population NK « mémoire » restreinte au foie NK avec une réponses secondaire spécifiques à l'antigène.

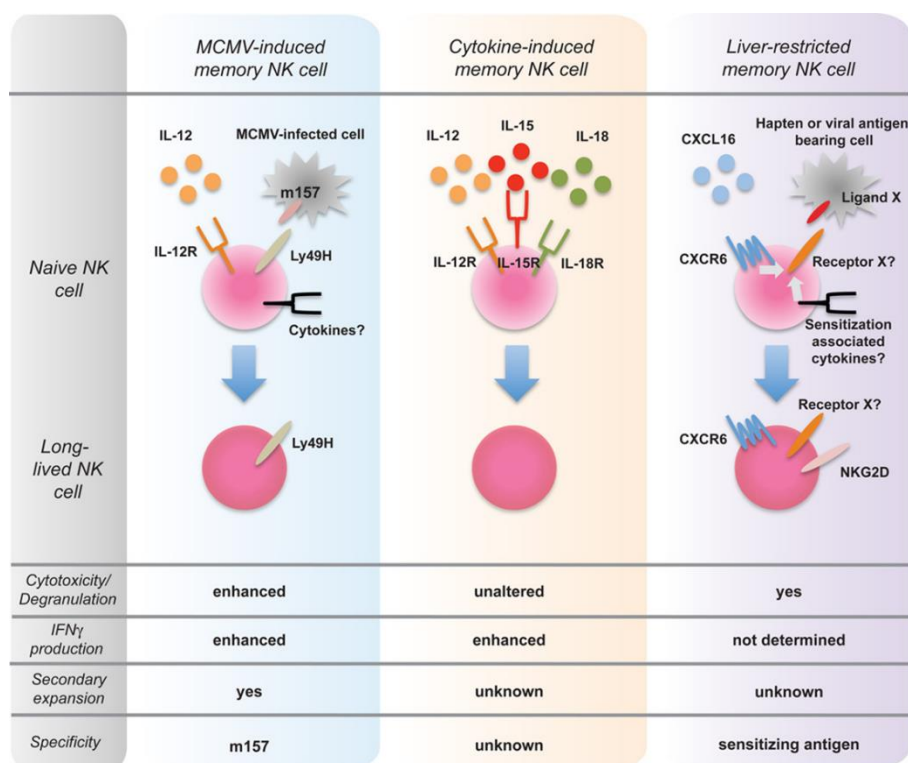


Figure 3. La cellule NK : trois voies possibles pour se différencier en cellule mémoire [12].

Chez l'homme, la génération de cellules NK mémoires est suggérée, notamment par la voie des cytokines [12, 35]. Cependant, à part les critères fonctionnels, il n'existe pour le moment aucun marqueur spécifique pouvant clairement distinguer cette population NK dite « mémoire ». Leur identification se base sur un faisceau d'éléments incluant entre autres, le contexte ayant conduit à leur génération.

L'existence d'une telle population NK « mémoire » soulève plusieurs questions, d'une part quant à l'appartenance réelle des cellules NK au compartiment inné, et d'autre part quant à la définition même du système immunitaire inné et adaptatif.

Pour résumer cette partie concernant le développement des cellules NK chez l'homme, on peut conclure que l'engagement dans la lignée NK se fait entre le stade 1/ pro-NK et le stade 3/ iNK, et la maturation phénotypique et fonctionnelle se fait entre le stade 3 et les stades 4/5/6.

1.2. Développement des cellules NK en dehors de la moelle osseuse chez l'homme

Il est généralement admis que le développement des cellules NK se déroule principalement au sein de la moelle osseuse. En effet, comme en témoignent les expériences menées chez la souris, la perturbation du microenvironnement médullaire interrompt leur développement [36, 37]. Chez l'homme, il est aussi proposé que la moelle osseuse soit le site principal de développement des cellules NK humaines à partir d'un progéniteur CD34+ commun aux lymphocytes T et B. Cependant, la présence de précurseurs de cellules NK au niveau du tissu lymphoïde et du thymus chez l'homme [16, 38, 39], confortent l'hypothèse que leur développement peut s'initier au niveau de la moelle osseuse, mais les précurseurs peuvent ultérieurement migrer vers d'autres sites anatomiques pour y terminer leur différenciation en cellules NK mature.

2. Le répertoire NK

Contrairement aux lymphocytes T et B qui possèdent un récepteur réarrangé spécifique pour l'antigène dominant leur développement et leur activation, les cellules NK expriment constitutivement à leur surface un répertoire varié de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Ces récepteurs ne sont pas tous exprimés sur une cellule NK donnée et ont plutôt une distribution « stochastique ». Chaque cellule NK possède sa propre combinaison de récepteurs activateurs et inhibiteurs constituant ainsi son propre répertoire. Grâce à la richesse de ce répertoire, les cellules NK sont de véritables sentinelles et peuvent discriminer les cellules saines du « soi » des cellules transformées ou étrangères (soi altéré, ou non soi). L'intégration de tous les signaux issus de ces récepteurs conditionne la réponse NK.

2.1. Les récepteurs reconnaissant le CMH-I

Chez l'homme Les récepteurs reconnaissant les molécules classiques et non classiques du CMH de classe I appartiennent à différentes familles: les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines pour les Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) et les Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor (LIR/ILT), et les récepteurs hétérodimères CD94/NKG2 appartenant à la famille de récepteurs lectine de type C.

Les récepteurs KIR/CD158

Chez l'homme, les récepteurs de la famille KIR sont codés par des gènes regroupés au niveau du chromosome 19 au niveau du « Leucocyte receptor cluster » [40]. Les récepteurs KIR reconnaissent les molécules du CMH de classe I HLA-A, B et C. Chez un même individu, les différentes cellules NK expriment différentes combinaisons des récepteurs KIR. Ceci permet probablement d'augmenter leur sensibilité au changement d'expression des molécules du CMH classe I. Les KIR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. En fonction du nombre de leurs domaines extracellulaires, on peut distinguer deux sous-familles : KIR3D (trois domaines extracellulaires), et KIR2D (deux domaines extracellulaires). Outre le nombre de domaines extracellulaires, les récepteurs KIR diffèrent aussi par la longueur de leur domaine cytoplasmique, caractérisant ainsi les KIR inhibiteurs et les KIR activateurs. Les récepteurs à domaine intracellulaire long (KIR2DL et KIR3DL) contiennent deux motifs ITIM qui, en recrutant les phosphatases (SHP1 et SHP2), délivrent un signal inhibiteur [41-45]. Au contraire, les récepteurs à domaine intracellulaire court (KIR2DS et KIR3DS) sont dépourvus de motif ITIM. En revanche, ils peuvent transmettre un signal activateur en s'associant avec la protéine adaptatrice DAP12 qui possède un motif ITAM [46, 47].

Les récepteurs KIR ont pour rôle de prévenir l'activation des cellules NK vis-à-vis des cellules autologues normales tout en leur permettant de reconnaître des cellules ayant une expression altérée du CMH classe I suite à une transformation tumorale ou une infection virale [48, 49] (figure 4). Un nouveau rôle en tant que molécule chaperonne du TLR9 a été récemment attribué aux récepteurs KIRs et notamment au KIR3DL2. Ce derniers serait capable de reconnaître et de lier des motifs microbiens du type CpG-DNA pour les délivrer en intracellulaire au récepteur TLR9 aboutissant ainsi à l'activation des cellules NK (figure 4) [50]

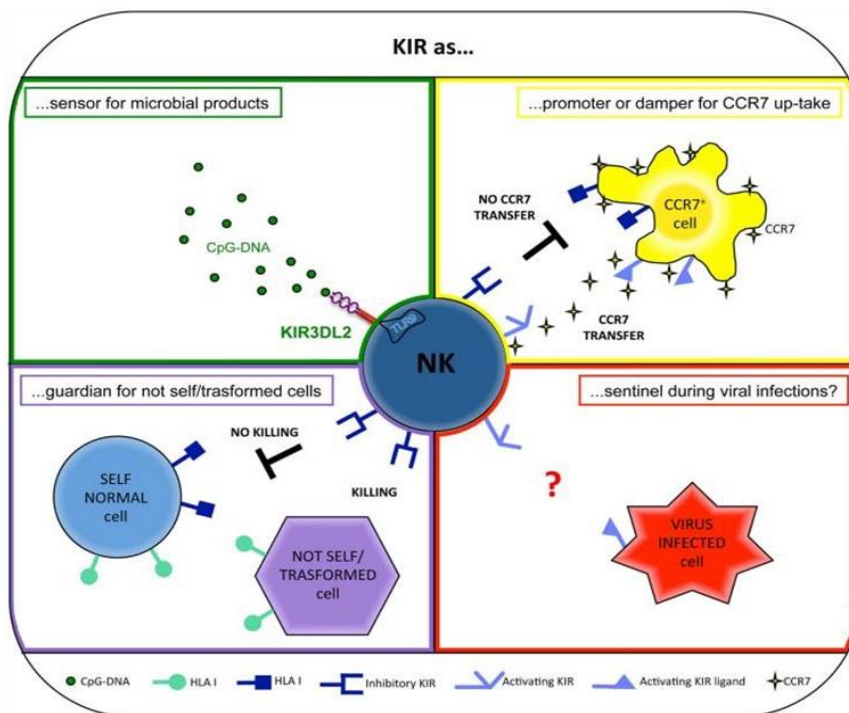


Figure 4. Les différents rôles des récepteurs KIR [49].

Les récepteurs CD94/NKG2

Les récepteurs CD94/NKG2 sont des protéines de type II appartenant à la famille des lectines C. Ils sont exprimés à la surface des cellules NK humaines sous la forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité commune invariante, le CD94, liée de façon covalente (pont disulfure) à une autre sous-unité de la famille NKG2 [51-53]. Les complexes CD94/NKG2A, CD94/NKG2B et CD94/NKG2C reconnaissent la molécule du CMH-I non classique HLA-E. Cette dernière présente des peptides dérivés de séquences signal des molécules du CMH-I classiques HLA-A, HLA-B, HLA-C et de la molécule du CMH I non classique HLA-G. L'expression membranaire de la molécule HLA-E est stabilisée par la fixation de ces séquences signal. De ce fait, le niveau d'expression de HLA-E reflète le niveau de synthèse des molécules du CMH-I. Ainsi les cellules NK contrôlent indirectement le niveau d'expression des autres molécules du CMH-I et directement celui de la molécule HLA-E grâce à l'interaction de cette dernière avec les complexes CD94/NKG2 [54-59]. Les hétérodimères CD94/NKG2A et CD94/NKG2B sont inhibiteurs tandis que l'hétérodimère CD94/NKG2C est un récepteur activateur [60, 61].

Les récepteurs ILT/LIR (Immunoglobulin like transcripts/Leucocyte Ig like Receptors)

Les récepteurs ILT/LIR constituent une grande famille qui comprend plusieurs récepteurs qui ont une large distribution cellulaire. Le récepteur LIR1/ILT2 est un récepteur inhibiteur qui peut être exprimé par les cellules NK. Ce récepteur peut reconnaître et interagir avec des molécules du CMH-I classiques et non classiques [62-65]. Le LIR1/ILT2 est également capable de lier la protéine UL18 synthétisée par le cytomégalo virus humain [64]. Cette interaction inhibe les cellules NK et participe ainsi à l'échappement viral à la réponse immunitaire [66].

2.2. Les récepteurs activateurs de la famille des NCR « Natural Cytotoxicity Receptors »

La famille des récepteurs NCRs est composée de 3 récepteurs activateurs: NKp46, NKp44 et NKp30. Ces récepteurs ne se ressemblent pas sur le plan structural, par contre ils partagent beaucoup de similitudes quant à leurs fonctions et leurs ligands. Les NCRs ont la capacité d'activer les cellules NK et surtout d'induire la lyse directe par cytotoxicité des cellules cibles lors de l'interaction avec leurs ligands respectifs (Tableau 1)[49]. NKp46 et NKp30 sont exprimés par les cellules NK au repos alors que l'expression de NKp44 est exclusivement induite sur les cellules NK activées. Ces récepteurs sont capables de reconnaître une variété importante de ligands dont le nombre ne cesse de croître. Ces ligands sont principalement exprimés par les cellules tumorales ou infectées par des virus (Tableau 1) [49, 67-79]. Outre leur capacité à reconnaître des ligands d'origine virale ou tumorale, les récepteurs NCRs peuvent reconnaître d'autres ligands présents sur les champignons ou les bactéries. Ainsi, NKp30 a été récemment impliqué dans la lyse directe de certains champignons tels que *Cryptococcus* et *Candida* (Tableau 1) [80], et NKp44 est capable de reconnaître directement certaines mycobactéries, notamment le BCG (bacille Calmette-Guérin), soutenant ainsi l'activation des cellules NK (Tableau 1) [81]. Par ailleurs, NKp44 est également capable de reconnaître des ligands présents constitutivement sur les chondrocytes issus de cartilages humains [82]. Les récepteurs NCRs constituent donc une arme très importante qu'utilise la cellule NK pour éliminer les cellules infectées ou bien transformées par un processus tumoral. Cependant, la diminution de l'expression des NCRs sur les cellules NK fait partie des subterfuges qu'utilisent certains virus pour échapper au contrôle des cellules NK [83].

Récepteur	Ligand/expression cellulaire	Effet de l'interaction
NKp30	B7-H6 (cellules tumorales)	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)
	BAT3/BAG6 H6 (cellules tumorales, cellules Dendritiques (DC))	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines, dialogue bidirectionnel NK/DC)
	ECTV HA (cellules infectées)	?
	VV HA (cellules infectées)	Inhibition
	Champignon: Cryptococcus et Candida, ligand?	Activation (cytotoxicité)
NKp44	21spe-MLL5 (cellules tumorales)	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)
	Hémagglutines virales (cellules infectées)	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)
	PCNA (cellules tumorales)	Inhibition
	BCG, ligand ?	Activation
	Trophoblast, ligand ?	Activation (cytotoxicité)
	Chondrocyte, ligand ?	Activation
	Lymphocyte T CD4+ au cours de l'infection par le VIH, ligand ?	Activation
NKp46	Hémagglutines virales (cellules infectées)	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)
	Cellules tumorales, ligand?	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)
	Cellules Dendritiques infectées par le CMV, ligand ?	Activation (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)
	Trophoblast, ligand ?	Production de chimiokines par les cellules NK déciduales

Tableau 1. Les récepteurs NCRs et leurs ligands. BAT3: HLA–B-associated transcript 3, ECTV: ecteromelia virus, VV: vaccinia virus, NDV: newcastle disease virus. Adapté de [49].

2.3. Le récepteur NKG2D (Natural-Killer group 2 D)

NKG2D est un récepteur activateur appartenant à la famille des lectines. Il s'agit d'un homodimère exprimé de manière constitutive sur les cellules NK, les T CD8 $\alpha\beta$, les cellules T $\gamma\delta$, ainsi que sur une sous population de lymphocytes T CD4+ [84, 85]. NKG2D reconnaît des ligands du soi dont l'expression est fortement induite lors d'un stress cellulaire (transformation tumorale, infection virale, lésion de l'ADN). Chez l'homme, NKG2D reconnaît et interagit avec une grande diversité de ligands tous apparentés aux molécules du CMH de classe I: les molécules MICA et MICB (Major histocompatibility complex class I related chain A et B), et les ULBPs (UL-16 binding protein) (figure 5) [84, 86].

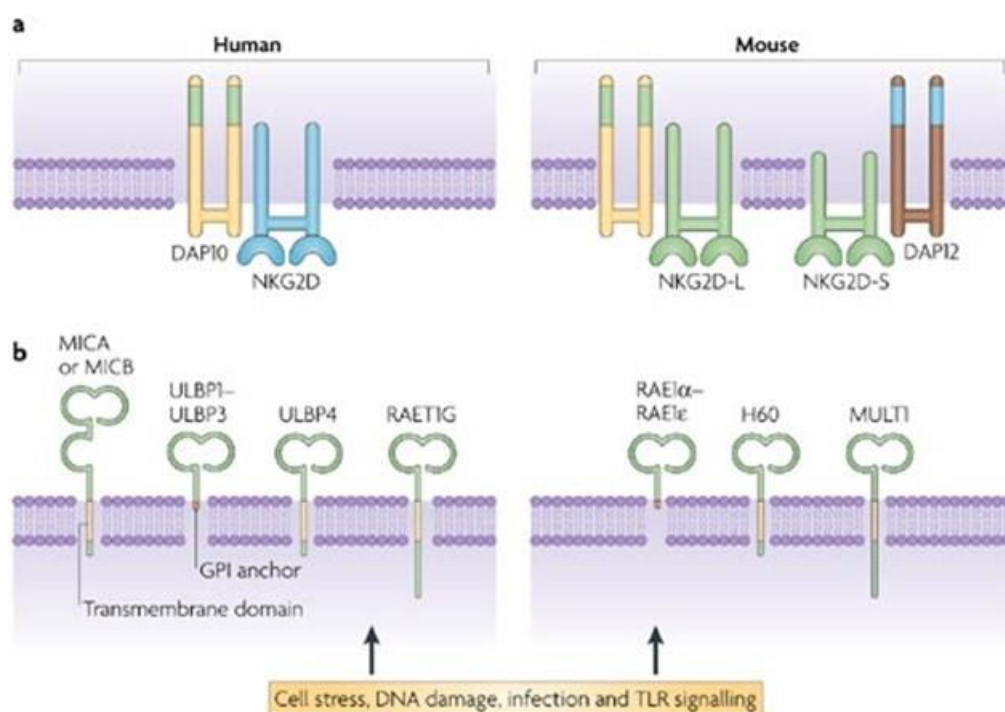


Figure 5. NKG2D et ses différents ligands chez l'homme et chez la souris [86].

L'interaction de NKG2D avec ses ligands induit la formation d'un signal activateur. Pour pouvoir transmettre ce signal, NKG2D s'associe à la molécule adaptatrice DAP10 chez l'homme, et à DAP10 ou KARAP/DAP12 chez la souris [87, 88]. NKG2D joue un rôle important dans l'élimination des cellules infectées ou tumorales. Cependant, les virus et les tumeurs ont développé plusieurs stratégies d'échappement à son action. Parmi lesquelles, on

peut citer la sécrétion de facteurs solubles tels que Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ou la Prostaglandine E2 (PGE2) qui ont la capacité de moduler l'expression de NKG2D [83, 89, 90].

2.4. DNAM-1

Le co-récepteur DNAX accessory Molecule-1 (DNAM-1), ou CD226 est une molécule d'adhésion leucocytaire exprimée chez l'homme sur les cellules NK, les monocytes, et les lymphocytes T [91]. DNAM-1 est impliqué dans la lyse cellulaires par les cellules NK de plusieurs cibles d'origine tumorale [91]. DNAM-1 est également impliqué dans les interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques [92]. L'expression de ses ligands CD112 (Nectin-2) et CD155 (ou poliovirus receptor PVR) est large et peut être augmentée dans divers situations pathologiques telles que les infections virales et les processus tumoraux [93]. DNAM-1 jouent un rôle important dans l'immuno-surveillance contre les processus tumoraux surtout concernant les tumeurs peu immunogènes ou bien n'exprimant pas les ligands de NKG2D [93].

2.5. CD161

Le récepteur CD161 appartient à la famille des lectines C et est exprimé sur la majorité des cellules NK [94]. Chez l'homme, son ligand LIT1 est exprimé à faible niveau sur les cellules NK, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques et les ostéoblastes. Son expression est par contre fortement induite sur les lymphocytes B et les cellules dendritiques après activation, favorisant ainsi les interactions entre les cellules présentatrices de l'antigène et les cellules NK [94, 95]. Chez l'homme, l'interaction de CD161 avec son ligand inhibe la cytotoxicité et la sécrétion des cytokines par les cellules NK [94, 95].

2.6. Autres récepteurs activateurs

Le récepteur 2B4

2B4 (CD244), appartient à la famille des récepteurs SLAM (Signaling Lymphocyte-Activation Molecule). 2B4 est exprimé sur les cellules NK, les lymphocytes T, les monocytes ainsi que

sur les éosinophiles [96-98]. Le ligand de 2B4 est la molécule CD48 largement exprimé sur les cellules hématopoïétiques [99]. Chez l'homme, le récepteur 2B4 semble être un récepteur activateur des cellules NK [100-103].

Le récepteur NKp80

NKp80 est un récepteur activateur de type lectine C. En s'engageant avec son ligand « activation-induced C-type lectin » (AICL), NKp80 stimule les fonctions cytotoxiques des cellules NK et favorise le dialogue bidirectionnel entre les cellules NK et les monocytes [104].

CD16/ FcγRIII

Comme précédemment décrit CD16 est un marqueur de maturité et est majoritairement exprimé sur les cellules NK CD56^{dim}. Le récepteur CD16 est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG. En s'engageant *via* le CD16, la cellule NK tue les cellules cibles recouvertes d'anticorps par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Chez l'homme, suite à la fixation des IgG, le CD16 s'associe avec les molécules FcεRIγ et CD3ζ qui contiennent des motifs ITAM dans leurs domaines cytoplasmiques, transmettant ainsi un signal activateur [105].

Les récepteurs « Toll-Like Receptors » (TLR)

Les récepteurs TLR sont capable de reconnaître des motifs et des caractéristiques conservés de différents pathogènes microbiens. Les cellules NK peuvent exprimer les TLR2, TLR3, TLR5, TLR7/8 et TLR9. Cette expression leur permet en conséquence de reconnaître et de détecter la présence de différents pathogènes de nature virale ou bactérienne. En raison de leur large distribution, la stimulation *via* les TLR permet de coordonner la réponse immunitaire de plusieurs types cellulaire, telles que les cellules NK et les cellules Dendritiques, vis-à-vis d'un même pathogène [49].

3. Education des cellules NK : activation et tolérance au soi

3.1. Les premières modèles de l'éducation des cellules NK

Les cellules NK peuvent exprimer différents récepteurs activateurs capables de reconnaître les molécules du soi. L'interaction entre un récepteur inhibiteur et une molécule du CMH-I du soi constitue un garde-fou et prévient l'activation des cellules NK contre les cellules autologues saines. C'est sur cette base que les deux premiers modèles « missig-self » et « at least one » expliquant l'activation et la tolérance au soi des cellules NK, ont été établis.

Les observations montrant que les cellules NK tuent de manière préférentielle des cibles n'exprimant pas les molécules du CMH I ont été à l'origine du modèle du « missing-self » (ou « Soi manquant ») [106, 107]. Les cellules autologues saines exprimant normalement les molécules de CMH-I sont donc protégées contre l'autodestruction par les cellules NK. Les récepteurs KIR chez l'homme constituent la base moléculaire de ce concept. Cependant, les globules rouges par exemple n'expriment pas le CMH-I et ne sont pas détruits pour autant par la cellule NK autologue. Chez les patients qui souffrent d'un déficit en TAP2, et qui par conséquent ne peuvent pas exprimer les molécules du CMH-1, la tolérance au soi des cellules NK est maintenue et implique des mécanismes et des récepteurs indépendants de la reconnaissance du CMH-I [108].

Le modèle du « at least one » ou « au moins un récepteur inhibiteur » propose que l'expression par la cellule NK d'au moins un récepteur inhibiteur qui reconnaît le CMH-I du soi suffise à protéger les cellules de l'auto-agression par les cellules NK [109]. Ce qui suppose que chaque cellule NK possède au moins un récepteur inhibiteur reconnaissant le CMH-I du soi. Toutefois, on sait maintenant qu'il existe des cellules NK n'exprimant aucun de ces récepteurs inhibiteurs parmi ceux identifiés à ce jour. Ces cellules non seulement ne sont pas auto-agressives mais en plus elles sont hypo-réactives avec un potentiel lytique réduit [110, 111]. Les cellules NK dont le développement s'est déroulé en l'absence des molécules du CMH-I sont également hypo-fonctionnelles [112, 113].

Les deux concepts « missig-self » et « at least one », sont donc insuffisants pour expliquer l'éducation et le maintien de la tolérance au soi des cellules NK. D'autres théories et concepts ont été proposés.

3.2. Les modèles actuels de l'éducation des cellules NK : le « Licencing »

Au cours de son développement, la cellule NK doit entrer en contact avec les molécules du CMH-I pour avoir le « licencing » ou le « permis de tuer » ainsi que la capacité à réagir aux stimuli ultérieurs. Elles deviennent donc « licenced » [114-116]. Le corollaire est que les cellules NK qui ne peuvent pas reconnaître le CMH-I du soi au cours de leurs développements, sont hypo-réactives et donc « unlicensed ». Cet état « unlicensed » ne correspond pas forcément à un manque de maturité. En effet, des expériences menées sur des modèles murins montrent que les cellules NK dépourvues de récepteurs inhibiteurs spécifiques pour le CMH-I répondent faiblement en présence de cibles déficientes en molécules du CMH-I. Cependant, après stimulation par PMA/ionomycine, elles restent capables de produire des quantités d'IFN- γ comparables aux cellules NK exprimant des récepteurs spécifiques du CMH-I, montrant ainsi un certain degré de maturité. De plus, sur le plan phénotypique, les marqueurs de surface ne sont pas altérés, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur d'un phénotype plutôt mature des cellules NK « unlicensed » [111]. Chez l'homme, plusieurs arguments suggèrent que la théorie du « licensing » peut également être retenue. En effet, approximativement 10% des cellules NK CD56^{dim} n'expriment pas les récepteurs KIR ou les NKG2A. Ces cellules sont fonctionnellement inhibées en comparaison avec leurs homologues NK NKG2A+KIR+. De manière comparable à ce qui est observé dans les modèles murins, ces cellules NK NKG2A-KIR- ne semble pas être immatures [110].

La théorie de l'éducation des cellules NK par le « licencing » implique des mécanismes qui peuvent être expliqués par deux modèles : le modèle d'armement ou « arming » et le modèle de désarmement ou « disarming ». Le troisième modèle du « rhéostat » vient compléter cette théorie du « licencing ».

L'éducation des cellules NK est tributaire de la signalisation *via* les récepteurs inhibiteurs puisque les mutations touchant leurs motifs ITIM rendent les cellules NK hypo-réactive et ce, même en présence des molécules du CMH-I reconnues par ces récepteurs mutés [114]. Selon l'hypothèse de l'armement, les cellules NK sont hypo-réactives par défaut. Au cours de leur développement, l'engagement de leurs récepteurs inhibiteurs spécifique du CMH-I permet de les armer et leur octroie la licence ou le permis de tuer. Ces cellules deviennent ainsi compétentes et fonctionnelles [114]. Au contraire, l'hypothèse du "désarmement" propose que les cellules NK ne soient pas initialement hypo-réactives. Au cours de leur développement, elles entrent en contact avec les cellules environnantes en engageant leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs. En l'absence d'interaction entre les récepteurs inhibiteurs et les molécules du

CMH-I, la cellule NK subirait alors une stimulation chronique par des signaux activateurs non compensés par des signaux inhibiteurs. La résultante conduirait à un état d'anergie se traduisant par l'hypo-réactivité des cellules NK qui deviennent alors « unlicensed » et tolérante au soi [117, 118].

Le modèle du "rhéostat" n'est pas un système binaire qui ne se comprend qu'en présence ou en l'absence d'une signalisation inhibitrice générée par la reconnaissance des molécules du CMH-I. Ce modèle propose au contraire que la réactivité des cellules NK dépendrait de l'intensité des signaux inhibiteurs perçus à travers l'interaction avec les molécules du CMH-I. Ainsi, la réactivité d'une cellule NK donnée serait tributaire de plusieurs facteurs dont le nombre des récepteurs inhibiteurs spécifique du CMH-I, ainsi que de l'affinité de chaque récepteur pour son ligand [117, 119-121]. De ce fait, le modèle du « rhéostat » permet d'intégrer les deux précédents dans un seul schéma pour fournir une meilleure compréhension du processus d'éducation des cellules NK et du maintien de leur tolérance au soi. La figure 6 résume les 3 modèles proposés pour l'éducation des cellules NK.

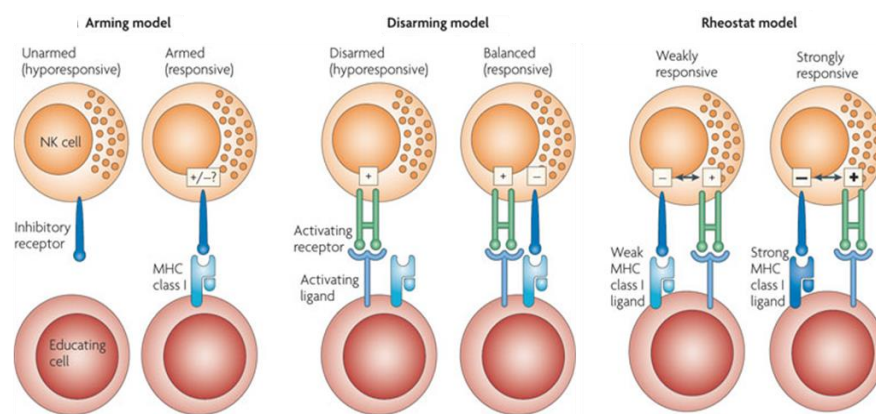


Figure 6. Les différents modèles proposés pour l'éducation des cellules NK, adapté de

4. Les fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK ne sont pas uniquement des cellules tueuses et leurs fonctions vont au-delà que leur nom ne le suggère. Faisant partie du système immunitaire inné, les cellules NK participent à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace à travers la sécrétion de différents médiateurs solubles et le dialogue bidirectionnel avec d'autres cellules immunitaires.

4.1. Les fonctions cytotoxiques des cellules NK

L'éducation des cellules NK assure qu'elle puisse s'activer et détruire des cellules cibles sans léser les cellules saines du soi.

La grande diversité des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK leurs permet de reconnaître directement différentes cibles en impliquant différents mécanismes. Dans un contexte viral ou tumoral, les cellules NK peuvent reconnaître les cellules infectées ou transformée grâce à la détection de la baisse d'expression des molécules du CMH-I, et/ou l'identification de molécules de stress ou de ligands d'origine virale. Cette reconnaissance active les cellules NK, et la cellule cible est détruite par dégranulation ou cytotoxicité naturelle. La présence de cellules opsonisées par les IgG peut également induire la dégranulation des cellules NK via le CD16, et les cellules cibles sont alors lysées par ADCC. La cytotoxicité naturelle et l'ADCC sont des mécanismes de lyse cellulaire dépendante de l'exocytose des granules lytiques qui contiennent essentiellement de la perforine et des granzymes. Suite à la reconnaissance de la cellule cible, la cellule NK forme avec cette dernière une synapse immunologique « lytique ». Elle subit alors une polarisation du cytosquelette d'actine, de l'appareil de Golgi ainsi que des microtubules, et une convergence des granules cytotoxiques vers la synapse lytique. Leur contenu est alors libéré [122]. L'ancrage et la polymérisation de la perforine au niveau de la membrane de la cellule cible, forme des pores et permet la pénétration des granzymes. Ces derniers, (granzymes A et B majoritairement) sont des enzymes du type sérine-protéases capables d'induire la mort cellulaire à travers la mise en jeu de mécanismes caspases-dépendants et indépendants [123].

Les cellules NK peuvent aussi induire l'apoptose des cellules cibles en utilisant d'autres mécanismes non dépendants de l'exocytose des granules lytiques. Ces mécanismes mettent en jeu les interactions entre les récepteurs de mort exprimés par les cellules cibles (Fas (CD95), TNFR1 (Tumor-Necrosis-Factor Receptor 1) et TRAIL), et leurs ligands exprimés par les NK (FasL (CD95L), TNF et TRAIL). Ces interactions jouent un rôle important dans « l'immunosurveillance ». Par exemple, grâce à la sécrétion de l'IFN- γ , les cellules NK sont capables d'induire l'expression du récepteur Fas à la surface des cellules tumorales. Ainsi, les cellules NK préparent le terrain pour lyser et éliminer les cellules tumorale *via* un mécanisme Fas dépendant [124].

4.2. Régulation de la réponse immune par les cellules NK

Production de chimiokines et de cytokines

Les cellules NK activées, par des cytokines ou par des cellules cibles, sont capables de produire une grande variété de chimiokines telles que MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES et IL-8/CXCL8 [125]. Cette production permet aux cellules NK d'amplifier la réponse immune en recrutant d'autres cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T, ainsi que d'autres cellules NK [126-128]. Les cellules NK produisent également des cytokines pro-inflammatoires, en particulier le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF- α) et l'Interféron γ (IFN- γ), qui sont capables d'activer les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que les cellules T (figure 7) [3, 125, 128]. Les cellules dendritiques ou les macrophages activés coopèrent à leur tour pour établir un microenvironnement propice à l'activation des cellules NK, et ce à travers la sécrétion de différentes cytokines telles que l'IL-15, l'IL-12, IL-18 et les interférons de type I [128] (figure 7).

Les cellules NK, en particulier les CD56^{bright}, peuvent également sécréter d'autres cytokines immuno-régulatrices telles que « tumor necrosis factor β » (TNF- β), IL-13, « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) » ou encore la cytokine IL-10 [21]. La sécrétion de l'IL-10 par une fraction de cellules NK les rend capables de réprimer la prolifération et les fonctions sécrétrices des lymphocytes T en réponse à des stimuli antigéniques. Ainsi, l'IL-10 confère aux cellules NK des fonctions immunosuppressives [129].

Les interactions avec les cellules dendritiques

Les interactions et le dialogue croisé entre les cellules NK et les cellules dendritiques revêtent plusieurs aspects selon le contexte et le degré de maturation des cellules dendritiques. Comme précédemment décrit, les cellules NK et les cellules dendritiques s'activent réciproquement à travers la sécrétion de plusieurs facteurs solubles. Les cellules NK activées produisent du TNF- α et de l'IFN- γ qui tous les deux participent à l'activation et la maturation des cellules dendritiques. En retour, la sécrétion de l'IL-12 par les cellules dendritiques myéloïdes mature et de l'IFN- α par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, active les cellules NK, stimule leurs fonctions cytotoxiques et soutient la sécrétion de l'IFN- γ et du TNF- α , constituant ainsi une boucle auto-amplificatrice de la réponse immune (figure 7) [3, 128]. Les cellules dendritiques sont également de grandes productrices d'IL-15, cytokine cruciale pour le maintien et l'activation des cellules NK et des lymphocytes T. En produisant de l'IFN- γ , les cellules NK

induisent l'expression membranaire de l'IL-15 sur les cellules dendritiques, participant ainsi à l'activation des lymphocytes T CD8+ [130]. Les cellules NK peuvent également dialoguer avec les cellules dendritiques par contact cellulaire, et notamment à travers l'interaction du récepteur NKp30 avec un ou des ligands exprimés sur les cellules dendritiques. Ce type d'interaction peut conduire soit à la maturation des cellules dendritiques, soit à la lyse des cellules dendritiques immatures par les cellules NK activées [131, 132].

En détruisant des cellules cibles (tumorales par exemple) et en activant les cellules dendritiques, les cellules NK aident à la présentation croisée d'antigènes cellulaire par les cellules dendritiques et optimisent les conditions pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace [3, 128, 133].

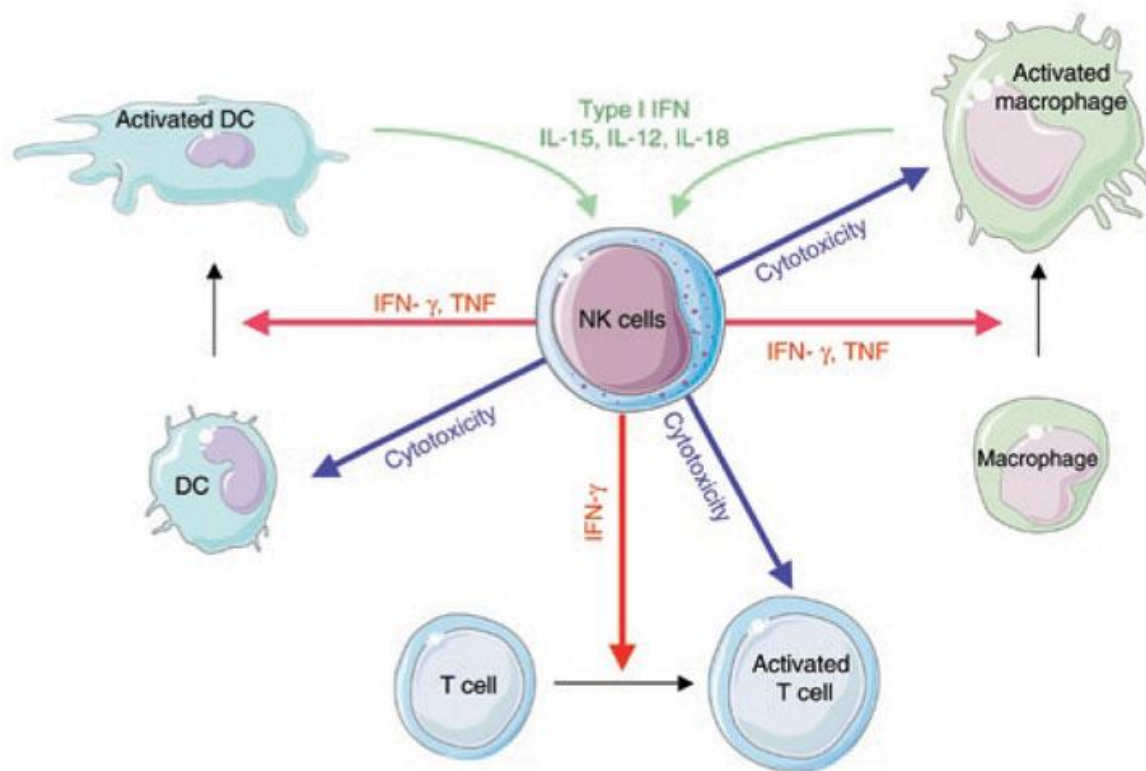


Figure 7. Régulation de la réponse immunitaire à travers les différentes interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes T. Suite à l'activation par divers facteurs solubles telles que l'IL-15, les interférons de type I, l'IL-12 et IL-18, les cellules NK favorisent la maturation et l'activation des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes T (flèches rouges). Au contraire, les cellules NK peuvent également éliminer cellules dendritiques immatures, les lymphocytes T CD4+ activés ainsi que des macrophages hyper-activés (flèches bleues) [128].

Les interactions avec les lymphocytes T

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les cellules NK régulent les fonctions des lymphocytes T de diverse manière, en agissant à la fois sur les cellules dendritiques et sur les lymphocytes T eux-mêmes. Les cellules NK secrètent plusieurs facteurs solubles telles l'IFN- γ et l'IL-8/CXCL8 qui permettent d'activer et de recruter les lymphocytes T. De plus, les cellules NK participent à la maturation des cellules dendritiques et favorisent la présentation croisée des antigènes, permettant ainsi l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative orientée vers un type Th1 sous l'action de l'IFN- γ (figure 7) [3, 128]. Par ailleurs, à travers la sécrétion de l'IL-10, les cellules NK peuvent également se comporter en tant que cellules immunosuppressives vis-à-vis des T CD8+ [129]. Cependant, les lymphocytes T, et plus précisément les cellules T régulatrices (Treg), influencent à leur tour le comportement des cellules NK. Plusieurs données récentes montrent clairement que les cellules Treg Foxp3+ peuvent inhiber l'activation des cellules NK en utilisant différents moyens. Ainsi, par contact cellulaire, le TGF- β membranaire exprimé sur les Treg permet à ces dernières d'inhiber les cellules NK. Les Treg peuvent également priver les cellules NK de l'IL-2 en inhibant sa production par les lymphocytes T CD4+ activés, mais aussi en entrant en compétition avec les cellules NK pour la consommation de l'IL-2 (figure 8) [134].

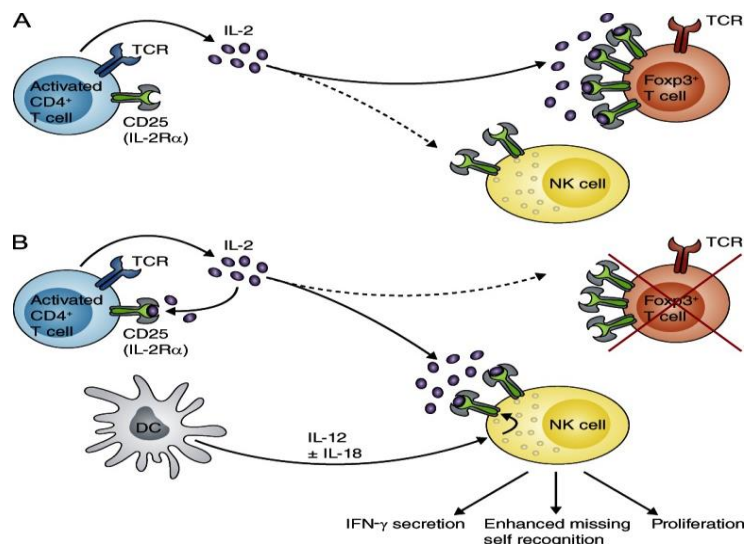


Figure 8. Les interactions entre les cellules NK et les lymphocytes T. A) Les lymphocytes T CD4+ stimulent l'activation des cellules NK *via* la sécrétion de l'IL-2 mais les Treg privent les cellules NK de l'IL-2. B) En l'absence de Treg, l'IL-2 devient disponible et active les cellules NK [134].

4.3. Les cellules NK utérines (uNK)

Lors de la gestation, le placenta représente une interface materno-fœtale au niveau de laquelle le système immunitaire maternel entre en contact direct avec le trophoblaste, un tissu « semi-étranger » provenant du fœtus. Le plus souvent, les grossesses se passent bien et le système immunitaire maternel ne rejette pas le fœtus. Le mystère qui entoure la tolérance materno-fœtale, surtout dans l'espèce humaine, commence à peine à être dévoilé. Les lymphocytes sont présents au niveau de l'interface materno-fœtale et plus particulièrement les cellules NK utérines (uNK). A la différence des cellules NK circulantes, les uNK ont une faible cytotoxicité envers des cibles classiques telles que les cellules K562 et ne sont pas cytotoxiques vis-à-vis des cellules du trophoblaste [5]. Le rôle des cellules NK utérine serait de coopérer avec les cellules trophoblastiques pour assurer le bon déroulement de la placentation et un remodelage efficace des artères spiralées [5]. Un remodelage déficient de la vascularisation utéroplacentaire constitue un facteur prédisposant au risque de pré-éclampsie [135].

5. Mécanismes d'échappement à la réponse immune NK

Les virus et les tumeurs ont développé plusieurs stratégies pour tromper le système immunitaire afin d'échapper à la réponse immune aussi bien adaptative qu'innée. Si la baisse d'expression des molécules du CMH-I constitue un mécanisme d'évasion à la réponse des lymphocytes T CD8+, elle devrait normalement alerter les cellules NK et induire la lyse des cellules infectées ou tumorales. Cependant, les virus ou les cellules tumorales utilisent d'autres moyens pour échapper à la réponse NK. Le problème est double lorsqu'il s'agit de virus oncogènes tel que le virus HHV8. Les mécanismes d'échappement se multiplient pour permettre au virus de se dissimuler et de persister le plus longtemps possible afin d'induire à bas bruit les transformations tumorales.

5.1. Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse NK

Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans le maintien et la progression du processus néoplasique. Ce microenvironnement est riche en facteurs solubles qui assurent la

survie et la prolifération des cellules tumorales tout en réprimant la réponse immune de l'hôte. Le « vascular endothelial growth factor » (VEGF), la Prostaglandine E2 (PGE2) et l'IL-8 sont tous des facteurs solubles connus pour leurs propriétés angiogéniques nécessaires à la croissance tumorale [136-138]. De plus, le VEGF et la PGE2 sont également pourvus de propriétés immuno-modulatrices qui leur permettent de dérégler la réponse immunitaire anti-tumorale [136]. La présence d'autres cytokines telles que le TGF- β et l'IL-10 rend le microenvironnement tumoral hautement immunosuppresseur. Parmi tous ces facteurs mentionnés, le TGF- β , et la PGE2 ont la capacité d'induire des altérations phénotypiques et fonctionnelles au niveau des cellules NK afin de réprimer leurs fonctions effectrices.

Le TGF- β

Le TGF- β est capable de diminuer l'expression des récepteurs activateurs NKG2D et NKp30 au niveau des cellules NK et entraver ainsi leurs fonctions cytotoxiques [139, 140]. Il est également capable de réprimer la production d'IFN- γ par les cellules NK, ce qui les prive de participer à la mise en place d'une réponse immune adaptative efficace [139].

Les cellules T régulatrices CD4+CD25+ (Treg), source importante de TGF- β , peuvent être recrutées et proliférer dans le microenvironnement tumoral [141]. Par le biais du TGF- β , les Treg contrôlent l'activation des cellules NK et inhibent leurs fonctions effectrices permettant ainsi la progression des tumeurs [142, 143].

La PGE2

La PGE2 est un médiateur lipidique ayant des fonctions immunosuppressives, sécrétée par de nombreuses cellules immunitaires ainsi que par les cellules tumorales de nombreux cancers [83, 144-147]. Elle est le produit de transformation de l'acide arachidonique par les cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2. La PGE2 a la capacité de promouvoir la croissance tumorale tout en inhibant les réponses immunes de l'hôte. Peu de travaux se sont intéressés aux effets de la PGE2 sur la réponse immune des cellules NK. Notre groupe a récemment montré que l'une des stratégies d'échappement à la réponse NK porte sur la modulation des voies d'activation NKG2D et IL-15 par la prostaglandine E2 (PGE2) d'origine tumorale [83]. En deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées à la PGE2 en tant que mécanisme régulateur limitant l'activation NK, et facteur immunosuppresseur associé à l'inflammation chronique et au cancer.

Les mécanismes d'échappement tumoral à la réponse NK sont nombreux. On peut encore citer la capacité de l'IL-10 à réprimer l'expression de MICA, ligand de NKG2D, à la surface des cellules tumorale [148]. A part la baisse d'expression des ligands des récepteurs activateurs, les cellules tumorales peuvent aussi augmenter l'expression des ligands des récepteur inhibiteurs des cellules NK [149].

Ainsi, les cellules tumorales optimisent leur microenvironnement de manière à ce qu'elles deviennent hautement résistantes à la réponse immune de l'hôte.

5.2. Mécanismes d'échappement viral à la réponse NK

Les cellules NK constitue une première ligne de défense contre les infections virales. Pour persister, les virus les neutralisent et les déroutent en utilisant diverses stratégies. L'effet peut être double : en compromettant les fonctions des cellules NK, la mise en place d'une réponse immune adaptative efficace se trouve également compromise.

Les mécanismes d'échappement viral à la réponse NK ne sont pas très différents des mécanismes d'échappement des cellules tumorales.

Au cours de l'infection par le VIH par exemple, la protéine Nef inhibe de manière sélective l'expression des molécules HLA-A et HLA-B au niveau des cellules infectées, mais pas celle des molécules HLA-C ou HLA-E. Ce mécanisme permet d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK tout en se déroband à l'action des lymphocytes T CD8+. Il s'agit donc d'une stratégie d'évasion supplémentaire visant les activités antivirales des cellules NK [150]. Au même titre que les tumeurs, les virus sont également capables d'induire la diminution d'expression de plusieurs ligands de récepteurs activateurs, telles que les molécules MICA ou les ULBPs ligands de NKG2D [151]. De plus, au niveau des cellules NK, les virus peuvent inhiber l'expression des récepteurs activateurs tels que les NCR et le NKG2D, et augmenter l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que les récepteurs KIRs inhibiteurs [90, 152, 153]. Sène et al. ont montré que l'infection chronique par le VHC s'accompagne d'une diminution de l'expression de NKG2D par les cellules NK, entraînant un déficit fonctionnel (cytotoxicité et sécrétion d'IFN- γ). L'origine de ce défaut est complexe. La protéine virale « Nonstructural protein 5A » (NS5A) est capable d'induire la production de l'IL-10 par les monocytes, tout en réprimant la sécrétion de l'IL-12 connue par ses effets activateurs sur les NK. À son tour, l'IL-

10 stimule la sécrétion de TGF- β responsable de la diminution de l'expression de NKG2D sur des cellules NK, et détériore ainsi leurs fonctions effectrices [90]. Dans un autre travail, Dupuy et al. ont montré que l'infection par le virus oncogène HHV8, s'accompagne d'importantes altérations phénotypiques des cellules NK avec des répercussions fonctionnelles. Chez les porteurs asymptomatiques, l'infection par le HHV8 s'accompagne d'une expression réduite de NKP30, NKp46 et du récepteur CD161. De plus, chez les patients avec un Sarcome de Kaposi actif, la diminution de l'expression de NKG2D vient s'ajouter aux altérations précédentes et renforce la répression qu'exerce le virus HHV8 sur les cellules NK [83].

L'altération de l'expression des récepteurs NK peut aussi compromettre le dialogue croisé et les interactions entre les cellules NK et d'autres cellules immunes. Par exemples, au cours de l'infection par le VIH, la diminution de l'expression de NKp30 perturbe les interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques [154]. Ce défaut permet aux cellules dendritiques immatures d'échapper à la lyse par les cellules NK. De plus la boucle auto-amplificatrice IL-12/IFN- γ n'est plus fonctionnelle et ne permet pas aux cellules NK et aux cellules dendritiques de s'activer mutuellement.

Les virus peuvent même utiliser les cellules NK pour affaiblir directement la réponse immune adaptative. En effet, au cours de l'infection par le VIH, exemple riche en mécanisme d'échappement à la réponse NK, l'expression d'un ligand de NKp44 est induite de manière inhabituelle sur les lymphocytes T CD4⁺ non infectées. Ces dernières deviennent une cible potentielle pour les cellules NK qui sont fréquemment activées au cours du VIH et expriment le récepteurs NKp44 [155].

5.3. La molécule PD-1 : nouveau mécanisme d'échappement à la réponse NK ?

Lors du travail mené sur la caractérisation fonctionnelle et phénotypique des cellules NK au cours de l'infection par le virus HHV8, notre équipe a mis en évidence de manière fortuite une expression inhabituelle de la molécule régulatrice PD-1 sur les cellules NK chez certains patients. Les effets de PD-1 sur la réponse NK ainsi que les facteurs induisant son expression ont été peu étudiés à ce jour surtout au cours des infections virales chroniques.

Notre hypothèse est que l'expression de PD-1 sur les cellules NK pourrait représenter un mécanisme supplémentaire d'échappement à la réponse NK au cours des infections virales chroniques.

Toute la première partie de ce travail de recherche porte sur l'étude des conséquences phénotypiques et fonctionnelles de l'expression de PD-1 sur les cellules NK au cours de certaines infections virales chroniques.

PARTIE II: PROGRAMMED-DEATH ONE

PARTIE II: PROGRAMMED DEATH-ONE (PD-1)

Le système immunitaire est constamment confronté aux difficultés d'assurer la défense contre les divers types de pathogènes rencontrés, sans débordement et sans rupture de la tolérance immune. Ces fonctions nécessitent une régulation fine et sophistiquée ainsi que la présence de plusieurs étapes de contrôles. La tolérance immune d'origine centrale (thymique pour les lymphocytes T et au niveau de la moelle osseuse pour les lymphocytes B) constitue une première étape de sélection qui permet d'éliminer la majorité des clones T ou B auto-réactifs. Cependant, certains clones auto-réactifs réussissent à passer ce premier filtre et se retrouvent en périphérie [156, 157]. Ce caractère imparfait de la tolérance immune d'origine centrale expose au risque de développement de réactions auto-immunes. Pour parer à cette insuffisance, le système immunitaire a développé plusieurs stratégies pour assurer le maintien de l'homéostasie immunitaire en périphérie. En l'occurrence et en prenant l'exemple du lymphocyte T naïf, il est actuellement bien établi que l'activation initiée suite à l'engagement du TCR par le complexe CMH-peptide est soumise à une régulation complexe. Cette régulation fait intervenir l'action de plusieurs co-récepteurs qui sont présents de manière constitutive ou inductible à la surface du lymphocyte T (figure 9). La résultante de toutes ces interactions détermine l'issue de sa réponse finale. Ainsi, les molécules de co-stimulation telles que CD28, ICOS et CD40 ont pour rôle d'amplifier le signal reçu par le TCR, tandis que les molécules co-inhibitrices telles que CTLA-4 et PD-1, peuvent soit l'abroger en délivrant un signal inhibiteur, soit perturber les voies de signalisation activatrices induites par le TCR [158]. Ces récepteurs co-inhibiteurs jouent un rôle critique dans la régulation négative et la terminaison de la réponse immune afin d'éviter un emballement immunitaire. Leur présence constitue donc un garde-fou et un rétrocontrôle négatif qui protège contre un endommagement excessif des tissus par les cellules T activées et contre l'auto-immunité.

Parmi ces récepteurs co-inhibiteurs, PD-1 a suscité depuis quelques années l'intérêt de nombreux travaux de recherche afin de caractériser sa structure, sa fonction, sa voie de signalisation ainsi que les pathologies qui peuvent lui être inhérentes ou associées. Cette molécule a été découverte initialement en 1992 par l'équipe de Tasuku Honjo en tant que molécule induite lors de la mort cellulaire programmée d'un hybridome T murin [159]. La mise en évidence de l'homologue humain de PD-1 (*Pdcd1*) a été réalisée quelques années plus tard par la même équipe. Le gène humain de PD-1 étant situé sur le chromosome 2 [160]. Depuis, de nombreux travaux ont contribué à mieux caractériser cette molécule et à mieux comprendre

ses fonctions. En effet, les souris déficientes pour PD-1 présentent spontanément des tableaux d'auto-immunités de phénotypes différents en fonction de leur fond génétique. Par exemple, les souris BALB/c PD-1^{-/-} développent une cardiopathie auto-immune [161], alors que les souris B6 PD-1^{-/-} présentent un tableau proche du lupus [162]. Ces modèles illustrent l'implication et l'importance de la molécule PD-1 dans le maintien de la tolérance immune.

1. Structure et expression du récepteur PD-1

PD-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui appartient à la superfamille des Immunoglobulines. Elle est composée d'un domaine IgV extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique qui contient deux motifs de signalisation de type « tyrosine-based signaling motifs » : un motif ITIM et un motif ITSM [160, 163, 164]. A cause de ses propriétés régulatrices et de la présence de similitudes structurales, la molécule PD-1 est assimilée à la famille des molécules de co-récepteurs CD28/CTLA-4 (figure 9). Contrairement aux autres membres de cette même famille, PD-1 ne contient pas dans sa structure membranaire le résidu cystéine proximal nécessaire pour l'homo-dimérisation. Les analyses structurales et biochimiques ont montré que PD-1 est une protéine monomérique aussi bien sous forme soluble que transmembranaire [165]. Une étude comparative entre CD28, CTLA-4 et PD-1 suggère que structurellement, la molécule PD-1 pourrait constituer un intermédiaire entre la famille des co-récepteurs CD28/CTLA-4 et les récepteurs à l'antigène. En effet, la structure de PD-1 présente aussi beaucoup d'homologie avec celle des récepteurs à l'antigène et la molécule CD8. Ainsi, il est envisageable qu'une protéine proche de PD-1 soit un précurseur des récepteurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines [166].

PD-1 est exprimé au cours du développement thymique des thymocytes CD4-CD8⁻ double négatifs durant le réarrangement TCR β [167, 168]. En périphérie, les lymphocytes T naïf au repos n'expriment pas ou très faiblement PD-1 à leur surface. Au contraire, l'activation cellulaire par le TCR induit transitoirement une expression importante de PD-1 et ce aussi bien chez l'homme que chez la souris [169-172]. La stimulation concomitante du TCR est nécessaire pour observer l'effet de l'engagement de PD-1 [170]. Cette restriction assure que l'inhibition des lymphocytes T est transitoire et dirigée uniquement vers les cibles spécifiques qui expriment le ligand du TCR. De façon intéressante, une étude conduite chez l'homme montre que les interleukines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 (ayant en commun la chaîne γ) sont capables d'induire l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T périphériques, ainsi que l'expression de

ses ligands sur les monocytes et les lymphocytes B et T [173]. Cette expression de PD-1 induite par les cytokines n'entraîne une inhibition fonctionnelle que si le TCR est engagé simultanément [173].

De la même manière que les lymphocytes T, les lymphocytes B naïfs au repos expriment faiblement PD-1 à leur surface. Chez la souris, l'activation du BCR induit une forte expression de PD-1 [169]. Cependant ce phénomène est moins évident chez l'homme et on n'observe qu'une faible augmentation de PD-1 suite à la stimulation du BCR. Toutefois, la stimulation du récepteur TLR9 est capable d'induire significativement l'expression de PD-1 sur les lymphocytes B humains [174].

Les cellules dendritiques ainsi que les monocytes/macrophages peuvent également exprimer PD-1 [172, 175-177].

Les cellules NKT sont aussi capables d'exprimer PD-1 au cours de certaines pathologies infectieuses humaines [178, 179].

Grâce à des modèles murins, il a été démontré que l'induction initiale de PD-1 suite à l'activation du TCR est au moins en partie sous la dépendance du facteur de transcription NFATc1 [180]. Une étude plus récente montre que l'action synergique de NFATc1, STAT3 et STAT4 renforce et soutient l'expression de PD-1 sur les T CD8+ [181]. Ainsi, par rapports aux lymphocytes T CD8+ activés par le TCR seul, l'action conjointe des cytokines IL-6 (STAT3) et IL-12 (STAT4) augmente l'expression de PD-1 [181].

Dans les macrophages murins, les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 jouerait un rôle important dans l'expression constitutive de PD-1 ainsi que celle induite par l'IFN- α [182].

Le caractère généralement transitoire de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T suggère l'existence de facteurs qui l'inhibent. L'utilisation des modèles murins d'infection aigue ou chronique par le(s) virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), a permis de montrer que les deux facteurs de transcription Blimp-1 et T-bet régulent négativement l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8 antiviraux [183, 184]. Ces travaux proposent aussi que des mécanismes de régulation similaires pourraient exister chez l'homme. Une autre étude suggère que la voie de signalisation Notch serait également impliquée dans la régulation de l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8+ activés [185].

De très nombreux travaux montrent que l'expression de PD-1 peut être anormalement prolongée et soutenue au cours de certains cancers et pathologies virales chroniques (ces données seront développées plus loin).

Il apparaît donc que les mécanismes de régulation de l'expression de PD-1 sont complexes et partiellement élucidés. La participation de plusieurs facteurs de transcription à la régulation de l'expression de PD-1 rend compte de sa grande capacité à répondre à de nombreux et différents stimuli, et le positionne comme ayant un rôle central dans la régulation immunitaire.

2. Les ligands de PD-1

PD-1 interagit avec 2 ligands connus: Programmed Death Ligand 1 (PD-L1, B7-H1 ou CD274) et Programmed Death Ligand 2 (PD-L2, B7-DC ou CD273). La protéine PD-L1 a d'abord été découverte en 1999 en tant qu'un nouveau membre de la famille des molécules B7 [186]. Les similitudes fonctionnelles et structurales entre PD-1 et CTLA-4 ont conduit à émettre l'hypothèse que le ligand de PD-1 pourrait être justement un membre de la famille B7. Ainsi, l'identification de PD-L1 en tant que premier ligand connu de PD-1 a été réalisée en l'année 2000 par la même équipe qui a découvert PD-1 [187] (figure 9). PD-L1 est une protéine transmembranaire de type I codée par le gène *Cd274* situé sur le chromosome 9 chez l'homme. Elle est composée d'un domaine extracellulaire comprenant des séquences Ig-V like et Ig-C like, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire pour lequel on ne connaît pas pour l'instant de fonction de signalisation claire [172, 186]. La molécule PD-L2, second ligand de PD-1, a été découverte un an plus tard [188, 189]. C'est également un homologue de la famille B7 et sa structure est proche de celle de PD-L1 (figure 9). Son gène *Pdcd11g2* est comme celui de PD-L1 situé sur le chromosome 9 chez l'homme.

Malgré la présence d'homologies structurales et d'un ligand commun, PD-L1 et PD-L2 présentent certaines différences qui concernent leurs profils d'expression cellulaire et leurs interactions avec PD-1.

Chez l'homme, PD-L1 a une large distribution cellulaire et peut être exprimé constitutivement ou de manière inducible par un grand nombre de cellules hématopoïétiques, notamment les monocytes, les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T et B activés [172, 174]. Nombreux sont les stimuli capables d'augmenter l'expression de PD-L1 sur les cellules hématopoïétiques chez l'homme. Par exemple, la stimulation des récepteurs à l'antigène (TCR ou BCR) renforce l'expression de PD-L1 sur les lymphocytes T et B, et l'activation par le ligand du TLR9 l'augmente sur les lymphocytes B [170, 174]. L'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 augmentent l'expression de PD-L1 sur les monocytes et à l'exception de l'IL-21 sur les lymphocytes T [173]. Par contre seule l'IL-21 induit une plus forte expression de PD-L1 sur

les lymphocytes B [173]. L'interféron- β et l'interféron- γ sont tous les deux capables d'induire et d'augmenter l'expression de PD-L1 sur les monocytes et/ou les cellules dendritiques [190, 191]. Différents tissus et plusieurs autres types cellulaires non-hématopoïétiques (cellules endothéliales, pulmonaires, kératinocytes, tissus hépatique...) peuvent également exprimer PD-L1 à leur surface [172].

L'expression cellulaire de PD-L2 est beaucoup plus restreinte que celle de PD-L1. Chez l'homme, l'expression de PD-L2 est inductible et principalement limitée à certaines cellules hématopoïétiques telles que les cellules dendritiques et les monocytes [172]. En comparaison avec PD-L1, PD-L2 est modérément mais significativement induit sur les monocytes par l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 [173]. Au contraire, l'interféron- γ induit une forte expression de PD-L2 comparable à celle de PD-L1 [191]. Des données plus récentes montrent que PD-L2 est inductible à la surface des lymphocytes T et B *via* l'activation du TCR ou BCR [174, 192]. L'activation par le TLR9 est également capable d'augmenter l'expression de PD-L2 à la surface des lymphocytes B [174].

Par ailleurs, l'expression des ligands de PD-1 peut être induite sur les cellules tumorales au cours de certaines pathologies néoplasiques (développé plus loin).

PD-L1 et PD-L2 interagissent avec PD-1 d'une manière compétitive mais avec des mécanismes différents. Certains suggèrent qu'ils n'ont pas la même affinité pour leur ligand commun et que la molécule PD-L2 humaine aurait trois fois plus d'affinité pour PD-1 que son homologue PD-L1. Mais les données de la littérature ne sont pas toutes concordantes à ce sujet [193, 194]. Fait important, ces 2 ligands ne sont pas spécifiques de PD-1 et n'interagissent pas exclusivement avec ce dernier. En effet, on connaît depuis quelques années au moins un 2^{ème} ligand pour PD-L1, il s'agit de la molécule B7-1, membre de la famille B7 et ligand de CD28 et CTLA-4 [195, 196] (figure 9). Toutefois, PD-L1 a une plus grande affinité pour PD-1 que pour B7-1 [196]. Des modèles murins ont permis de montrer que l'interaction de PD-L1 avec B7-1 est capable d'exercer un effet inhibiteur sur l'activation, la prolifération ainsi que les fonctions sécrétrices des lymphocytes T [195]. Une étude menée chez l'homme suggère qu'au cours de l'infection virale chronique par le VHC, l'activation de l'axe PD-L1/B7-1 régule négativement les Tregs CD4+CD25+FOXP3+. Cette régulation reste cependant accessoire par rapport à celle induite par l'engagement de l'axe PD-1/PD-L1 [197].

Pendant plusieurs années, PD-1 est resté le seul ligand connu de PD-L2 et leur interaction a un effet inhibiteur sur la réponse immune [188, 198]. Cependant, plusieurs études ont montré que PD-L2 peut aussi promouvoir la prolifération des cellules T et la production de cytokines, et ce même en l'absence de l'interaction avec PD-1 [199-201], suggérant la présence d'un deuxième

ligand pour PD-L2. Ce dernier vient d'être découvert, il s'agit de la molécule « repulsive guidance molecule b (RGMb) » exprimée au niveau du poumon. L'interaction de PD-L2 avec RGMb semble agir pour favoriser le maintien de tolérance immune au niveau de la muqueuse respiratoire [202].

En étudiant les affinités de l'interaction de PD-1 avec ses ligands aussi bien chez l'homme que chez la souris, une étude assez récente montre que cette interaction est faible surtout en comparaison avec l'interaction de CTLA-4 avec ses ligands. Cependant cette faible interaction serait quand même suffisante pour initier l'effet inhibiteur qu'exerce PD-1 sur le lymphocyte T [193].

L'étude par cristallographie du complexe PD-1/PD-L1 montre des similitudes structurales avec les domaines variables des récepteurs à l'antigène (TCR ou BCR), et ce en formant une surface semblable à celle qui est destinée à fixer les antigènes sur les anticorps et le TCR. Cette configuration suggère que le complexe PD-1/PD-L1 serait capable de lier une autre molécule [203].

Les deux ligands de PD-1 affichent donc beaucoup de similitudes mais aussi plusieurs différences. Ces dernières leurs confèrent des spécificités fonctionnelles non redondantes et ce malgré le chevauchement de leurs rôles respectifs dans la régulation immune. Les fonctions de PD-1 se trouvent ainsi diversifiées et son champ d'action élargi.

Vu sa large expression tissulaire, PD-L1 est plutôt impliqué dans le contrôle des lymphocytes T auto-réactifs et le maintien de la tolérance immune vis-à-vis des auto-antigènes [204, 205]. L'expression de PD-L2 étant généralement restreinte aux cellules présentatrices de l'antigène professionnelles, ce ligand serait donc plus impliqué dans le contrôle des réponses immunes vis-à-vis des antigènes environnementaux. On attribue plus à PD-L2 un rôle important dans le maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des muqueuses respiratoires et digestives [198, 202, 206, 207].

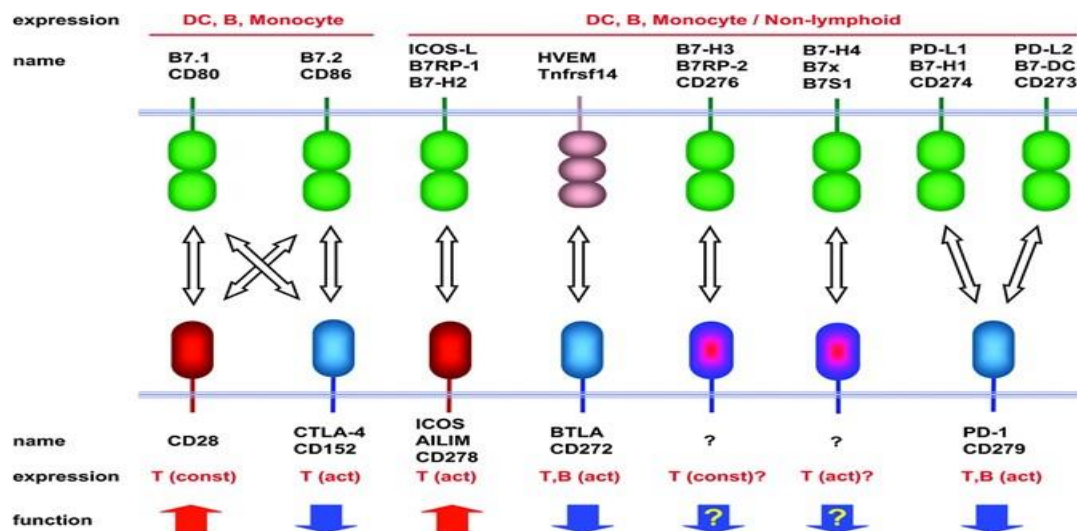


Figure 9. Les molécules de la famille des CD28 : membres et ligands. Les noms, le profil d'expression et la fonction sont indiqués. Act, expression suite à une activation; const, expression constitutive [208].

3. Voie de signalisation de la molécule PD-1

En tant que membre de la famille des CD28 et comme tous ses homologues, PD-1 agit en modulant la voie de signalisation des récepteurs à l'antigène (figure 10). PD-1 exerce ses fonctions grâce à la présence dans sa partie intra cytoplasmique de deux résidus Tyrosine : le 1er est situé dans le motif ITIM proximal, et le second dans le motif switch ITSM distal [160, 163, 164]. *In vitro*, certaines expériences utilisant une lignée B murine qui exprime divers mutants de PD-1 suggèrent que c'est le résidu tyrosine situé dans le motif ITSM qui serait essentiel pour la signalisation [209]. Des résultats comparables ont été trouvés en utilisant des lymphocytes T CD4⁺ primaires humains exprimant de manière artificielle (transduction) un récepteur PD-1 humain muté pour l'un ou l'autre de ses deux motifs de signalisation [171]. Par ailleurs, la séquence d'acides aminés qui entourent le motif ITSM est hautement conservée entre l'homme et la souris, ce qui suggère fortement une grande importance fonctionnelle de ce motif [209].

Lorsque le TCR est stimulé, l'engagement concomitant de PD-1 avec son ligand PD-L1 ou PD-L2 induit la phosphorylation de ses deux tyrosines permettant ainsi le recrutement de la phosphatase SHP-2 et probablement aussi de la phosphatase SHP-1 [171, 188, 209, 210] (figure

10). Ces dernières vont à leur tour inhiber des événements précoces de la signalisation du complexe TCR et du co-récepteur CD28 par déphosphorylation directe des molécules ZAP70, CD3 ζ et PKC θ , et inactivation en aval de PI3K qui devient à son tour incapable d'activer Akt [210-212]. De plus, PD-1 active la phosphatase PTEN qui à son tour réprime davantage la voie PI3K-Akt [213] (figure 10).

Il a été démontré que PD-1 exerce ses effets en *cis* et non pas en *trans*. Par conséquent le recrutement de PD-1 au sein même de la synapse immunologique à proximité du TCR est important pour que PD-1 exerce effets inhibiteurs sur le lymphocyte T [170, 210].

En inactivant PI3K, PD-1 inhibe directement l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-xL et affecte la survie du lymphocyte T [171] (figure 10). De plus cette inactivation réprime Akt, ce qui d'une part résulte en la perturbation du métabolisme du glucose, et d'autre part l'empêche de favoriser la production de l'IL-2 qui est elle-même une cytokine cruciale pour la survie et la prolifération des lymphocytes T [211] (figure 10). *In vivo*, PD-1 peut induire l'anergie du lymphocyte T CD8⁺ par inhibition précoce de la sécrétion autonome et autocrine de l'IL-2. Cet état est réversible par le blocage de l'interaction de PD-1 avec PD-L1 ou bien par l'apport exogène de l'IL-2 recombinante [214].

En inactivant ainsi la voie de signalisation PI3K-Akt mais aussi la voie ERK, PD-1 est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T par arrêt en phase G0/G1. Cet effet est en partie restauré par l'apport d'IL-2 [215]. De la même manière, en agissant sur ces deux voies et en perturbant le flux calcique intra cellulaire, PD-1 serait au moins en partie responsable de l'anergie des lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) [191].

PD-1 peut également inhiber certains facteurs de transcription comme GATA-3, T-bet et Eomes [216]. Ces facteurs sont cruciaux pour la différenciation et les fonctions effectrices du lymphocyte T [217-220].

Certaines études ont démontré qu'en perturbant la stabilité de la synapse immunologique formée entre le lymphocyte T et les cellules dendritiques, l'interaction PD-1-PD-L1 empêche l'activation du TCR. Ce qui constitue un mécanisme intéressant pour le maintien de la tolérance immune en périphérie [210, 221]. Par contre, dans un contexte d'infection virale chronique, une étude plus récente a montré que PD-1 peut empêcher les lymphocytes T CD8 antiviraux d'assurer leurs fonctions en induisant la paralysie de leur motilité. Dans ce contexte, cet effet permet la stabilisation de la synapse immunologique afin de favoriser l'engagement prolongé des voies régulatrices et inhibitrices telles que la voie PD-1/PD-L [222].

Les effets inhibiteurs qu'exerce PD-1 sur les fonctions effectrices du lymphocyte T seraient tributaires de son niveau d'expression et de la force de son signal. Ainsi, un haut niveau

d'expression est requis pour contrecarrer la production de MIP-1 β . Des niveaux d'expression inférieurs sont suffisants pour bloquer la cytotoxicité et la sécrétion de l'IFN- γ . En fin, des niveaux d'expression encore plus faibles inhibent la production du TNF- α et de l'IL-2 ainsi que l'expansion des cellules T [223].

En résumé, l'activation de la voie de signalisation de PD-1 permet d'abroger les effets du TCR et de la molécule de co-stimulation CD28. De ce fait, ces événements conduisent à une atténuation, voire une inhibition de l'activation, de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les fonctions effectrices ainsi que la survie du lymphocyte T sont également perturbées (figure 10). Au final, L'axe PD-1/PD-1 Ligands peut ainsi conduire à l'anergie du lymphocyte T voir même à sa suppression physique.

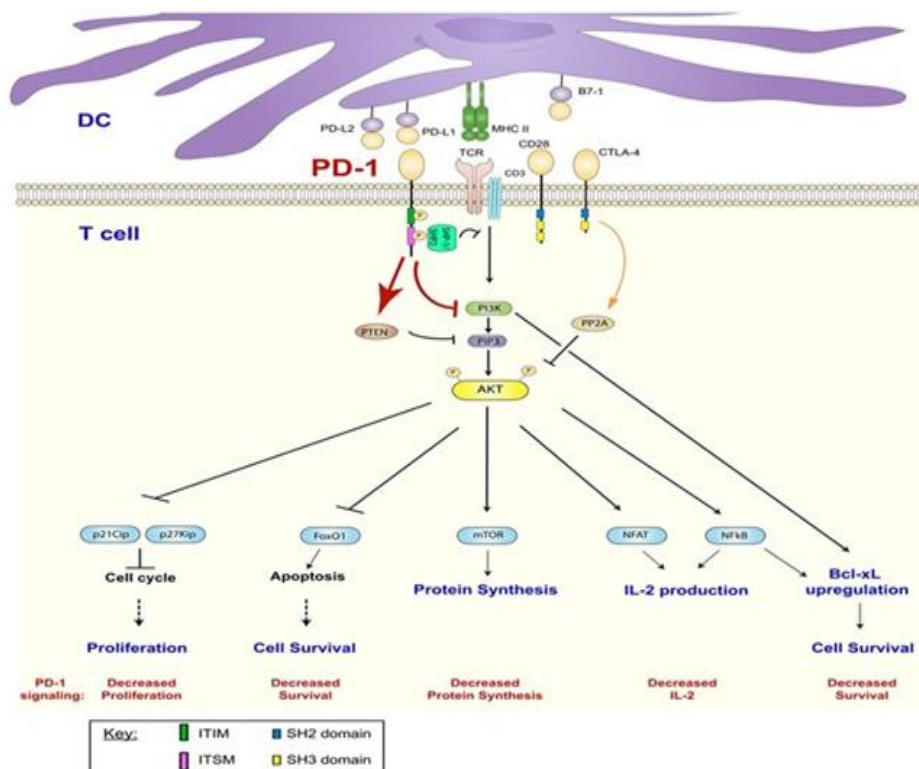


Figure 10. Voie de signalisation de PD-1 : l'engagement concomitant du TCR et de PD-1 avec leurs ligands respectifs entraîne au niveau de PD-1 la phosphorylation (P) des tyrosines des deux motifs ITIM et ITSM, et au recrutement subséquent de SHP-2 et/ou SHP-1. Ceci conduit à l'inhibition des signaux activateurs proximaux du complexe du TCR par déphosphorylation, et à l'augmentation de l'expression de PTEN. Au final, l'activation de la voie PI3K/Akt est atténuée ce qui peut aboutir à l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la survie du lymphocyte T, ainsi qu'à une diminution de la synthèse des protéines et la production des cytokines (es flèches et le texte en rouge indiquent la conséquence de la signalisation de PD-1) [224].

Vu les similitudes structurales et fonctionnelles qui existent entre PD-1 et CTLA-4 on peut se demander si leurs voies de signalisations respectives ne contiennent pas certaines redondances. En effet les deux récepteurs inhibent l'activation de Akt, cependant ils ne ciblent pas les même molécules. Comme décrit ci-dessus, pour inhiber Akt, PD-1 cible PI3K et peut ainsi agir directement sur le gène anti-apoptotique Bcl-xL. Au contraire, CTLA-4 n'agit pas sur PI3K mais plus en aval en activant la molécule PP2A qui à son tour inhibe Akt. L'effet anti-apoptotique de Bcl-xL est par conséquent préservé (figure 11).

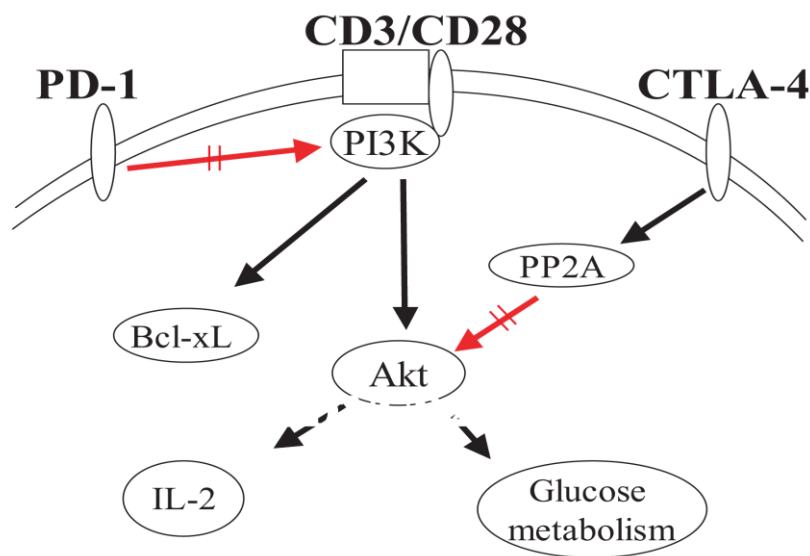


Figure 11. CTLA-4 et PD-1 inhibent l'activation de Akt en ciblant des molécules de signalisation différentes. PD-1 bloque l'activation de PI3K alors que CTLA-4 active PP2A [225].

La signalisation de PD-1 est beaucoup mieux caractérisée dans le lymphocyte T que dans le lymphocyte B ou les monocytes et les cellules dendritiques.

Grace à une lignée B murine, il a été démontré que le l'effet inhibiteur de PD-1 sur l'activation du lymphocyte B s'exerce de manière comparable au lymphocyte T. Le co-engagement de PD-1 et du BCR induit la phosphorylation des deux tyrosines de PD-1, ce qui permet le recrutement

et la phosphorylation de SHP2. SHP2 phosphorylée perturbe la transduction du signal du BCR par déphosphorylation de certaines molécules clés telles que la molécule Syk, et conduit ainsi à la désactivation en aval de PI3K, PLC γ 2 et ERK [209]. Chez l'homme, lorsque le BCR est stimulé, PD-1 est rapidement recruté à proximité pour former des « Clusters » avec le BCR. De plus, suite à la stimulation par le ligand du TLR9, PD-1 inhibe l'activation du lymphocyte B, sa prolifération ainsi que la sécrétion de l'IL-6 (cytokine importante pour le maintien du lymphocyte B). Cet effet est réversible par blocage de l'axe PD-1/PD-1 [174].

D'autres études suggèrent que PD-1 est également capable de réguler négativement des acteurs de la réponse immune innée telles que les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques [175, 177, 226].

4. Rôles physiologiques et pathologiques de PD-1

Comme précédemment décrit, les modèles animaux ont beaucoup aidé à la compréhension des fonctions de PD-1. Si les souris délétées pour le gène de PD-1 développent spontanément des maladies auto-immunes variables selon le fond génétique, le déficit en PD-1 confère aux souris une résistance contre les infections virales et les néoplasies [227, 228]. De la synthèse de toutes ces expériences il apparaît clairement que le rôle essentiel de PD-1 est de réguler négativement les réponses immunes développées contre le « soi » et le « non soi ». Ainsi l'axe PD-1/PD-1 ligands joue un rôle clé dans le maintien de la tolérance immune. Mais cette voie de régulation peut être parfois détournée au profit de certains virus ou bien de certains processus néoplasiques afin de compromettre les réponses immunes de l'hôte (figure 12).

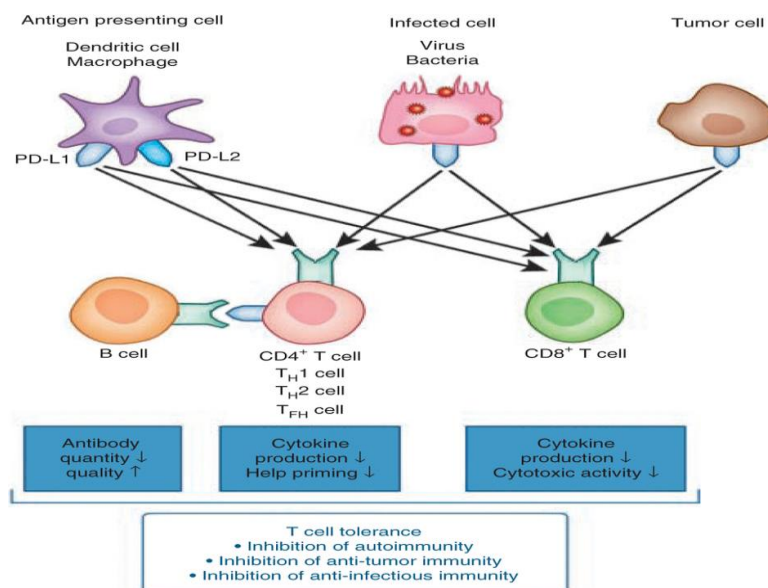


Figure 12: Les conséquences biologiques de la voie de signalisation de PD-1. L'expression de PD-1 est induite sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les B activés. L'expression des ligands est induite par les stimuli d'origine inflammatoire sur plusieurs types cellulaires. L'engagement de PD-1 avec ses ligands inhibe la prolifération et les fonctions effectrices des cellules T ainsi que la production des anticorps par les B. La résultante étant la protection contre l'auto-immunité mais aussi la diminution des défenses anti-tumorale et anti-infectieuses [229].

4.1. Rôle physiologique de PD-1 dans le maintien de la tolérance immune

PD-1 agit à plusieurs niveaux pour réguler et maintenir la tolérance immune. Au niveau central, la voie PD-1/PD-L semble pouvoir intervenir à différents stades du développement intra-thymique du lymphocyte T pour influencer et réguler leur maturation. Les ligands PD-L1 et PD-L2 sont exprimés au niveau du cortex et de la médullaire thymiques respectivement. PD-1 s'exprime sur les thymocytes double-négatifs (CD4-CD8-) à l'étape du réarrangement de leur TCR β et semble réguler négativement la sélection β en modulant la signalisation du complexe pré-TCR/CD3 [167, 168]. De plus, le déficit en PD-1 ou en PD-L1 augmente la proportion des lymphocytes T double-négatifs [230]. De la même manière et en agissant sur l'intensité des signaux de l'interaction des thymocytes, PD-1 semble également influencer la sélection négative [230]. Par ailleurs, une analyse génétique menée chez la souris NOD (modèle spontané de diabète auto-immun) suggère la participation de PD-1 à l'établissement de la tolérance immune centrale [231]. Collectivement, tous ces éléments suggèrent fortement que PD-1

participe à l'édification du répertoire des lymphocytes T matures et au processus de la tolérance d'origine centrale, en influençant plusieurs étapes du développement intra-thymique des lymphocytes T.

En périphérie, l'effet de PD-1 s'opère à plusieurs niveaux afin de pouvoir contrôler les clones auto-réactifs ayant survécu à la sélection négative. Comme précédemment décrit, PD-1 participe à la terminaison de la réponse immune: PD-1 abroge le signal activateur, limite l'expansion cellulaire ainsi que les fonctions effectrices.

Les antigènes du soi spécifiques d'un organe donné sont présentés par les cellules dendritiques au repos au sein même du tissu lymphoïde drainant cet organe. Les cellules dendritiques au repos exercent un pouvoir tolérogène par délétion ou anergie des lymphocytes T naïfs auto-réactifs. L'axe PD-1/PD-L semble être impliqué dans cette régulation et au contraire, le déficit en PD-1 résulte en l'activation du lymphocyte T auto-réactif [204, 232, 233].

En dehors des cellules hématopoïétiques et du tissu lymphoïde, PD-L1 est largement exprimé par d'autres types cellulaires dans différents tissus. Cette large expression permet à PD-1 de contrôler les lymphocytes T auto-réactifs au stade effecteur et au niveau même de l'organe cible, et ce en empêchant leur réactivation *in situ*. [205, 233].

Par contre dans un modèle d'infection viral, l'expression de PD-L1 au niveau du foie peut être néfaste en inhibant l'activité antivirale des cellules T effectrices exprimant PD-1. Mais il n'est pas exclu que ce mécanisme soit à l'origine protecteur pour éviter l'endommagement excessif des tissus de l'hôte [227].

Ensemble, ces données montrent qu'en périphérie, PD-1 limite les réponses des lymphocytes T auto-réactifs au niveau de deux sites anatomiques différents : le tissu lymphoïde et l'organe cible, et ce en contrôlant respectivement deux étapes différentes de leur différenciation: stade naïf (au moment de l'initiation de la réponse immune) et stade effecteur.

PD-1 et PD-L1 sont également exprimés par les cellules Treg CD4⁺Foxp3⁺ naturelles et adaptatives [224, 234]. En présence de TGF- β , l'interaction de PD-1 avec PD-L1 semble favoriser non seulement la conversion en périphérie des lymphocytes T CD4⁺Foxp3⁻ naïf en iTreg CD4⁺Foxp3⁺ mais permet aussi de promouvoir leur survie et leurs fonctions [235] (figure 13).

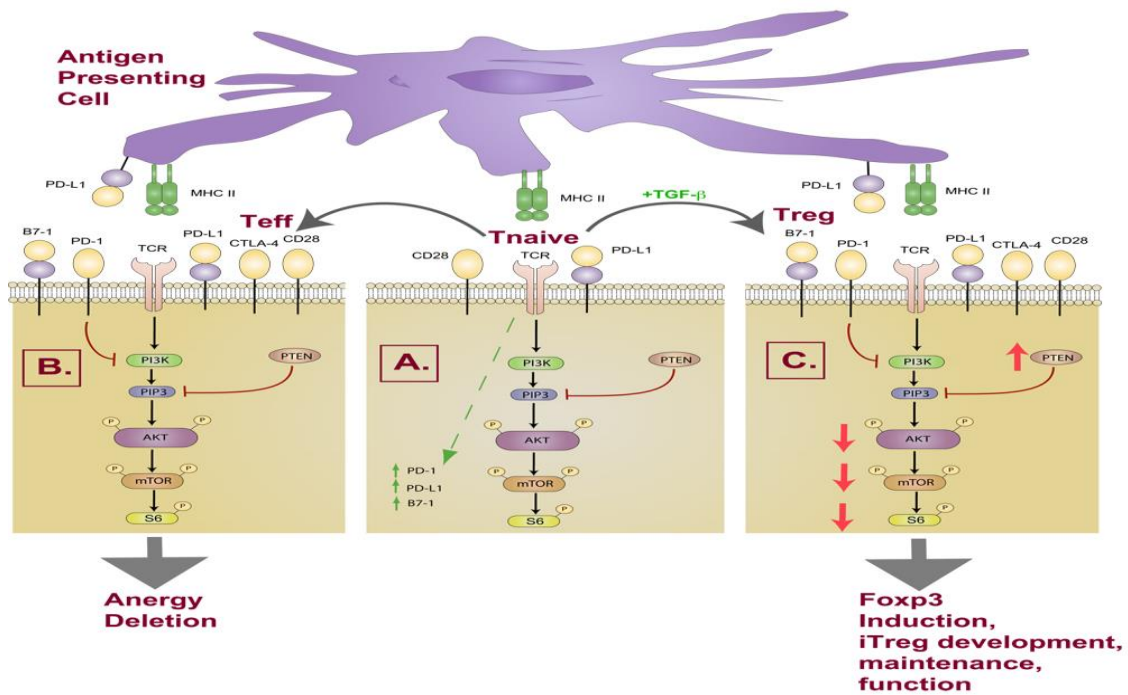


Figure 13. Les différents destins du lymphocyte T naïf suite à l'engagement de PD-1. (A) Induction de PD-1 et de PD-L1 suite à l'activation du TCR. (B) PD-1 inactive la voie PI3K/AKT et inhibe la différenciation et les fonctions effectrices du T naïf. (C) En présence de TGF- β , PD-1/PD-L1 atténue la signalisation de PI3K/AKT et induit de manière préférentielle le développement et la survie des iTreg [224].

Le fait que PD-L1 et PD-1 peuvent être exprimés par les lymphocytes T activés, les cellules dendritiques et les cellules Treg CD4+Foxp3+, suggère qu'il existe de multiples possibilités d'interactions et de régulations bidirectionnelles, et que les cellules Treg pourraient potentiellement induire un phénotype tolérogène des cellules dendritiques *via* l'interaction PD-1/PD-L1 [224]. Ceci constituerait un mécanisme supplémentaire par lequel PD-1 maintient en périphérie la tolérance immune.

La figure 14 résume les conséquences potentielles des différentes possibilités d'interactions entre les cellules dendritiques, les Treg et le lymphocyte T naïf à travers la mise en jeu de l'axe PD-1/PD-L1.

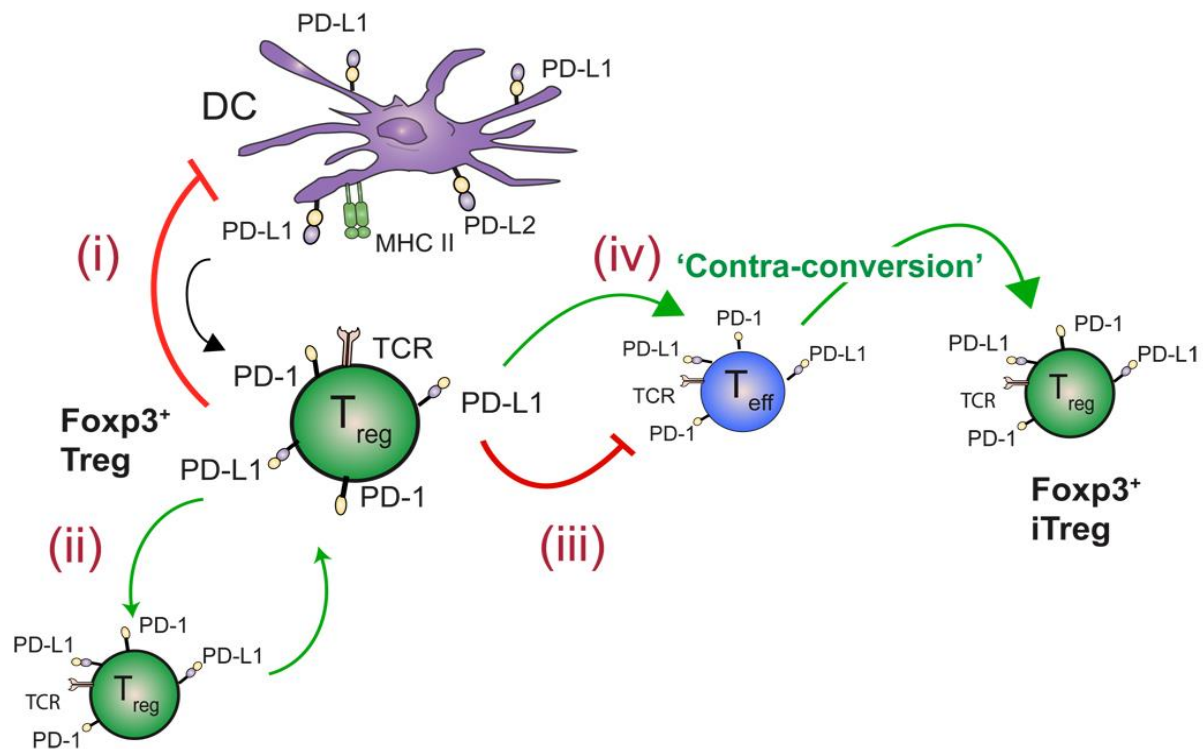


Figure 14. Les différents effets possibles de PD-1 lorsqu'il est exprimé par les Treg : (i) Les cellules dendritiques exprimant PD-L1 pourraient induire la conversion du lymphocyte T en iTregs Foxp3⁺. Suite à l'interaction entre avec les cellules dendritiques exprimant PD-L1, les Tregs pourraient induire un phénotype tolérogène des cellules dendritiques. (ii) Les cellules Tregs exprimant PD-L1 pourraient à leur tour soutenir l'expression de Foxp3 sur d'autres cellules Tregs et maintenir leurs fonctions. (iii) Tregs peuvent inhiber directement les fonctions effectrices et la survie des cellules T auto-réactives ou bien (iv) promouvoir la contre-conversion des T effecteurs en iTregs [224].

PD-1 a également le pouvoir de limiter l'expansion et les fonctions effectrices du lymphocyte B activé. De plus la voie PD-1/PD-L semble intervenir au niveau des centres germinatifs pour influencer la commutation des classes des immunoglobulines et l'hypermutation somatique [236]. Le défaut d'interaction de PD-1 avec ses ligands engendre au niveau de la moelle osseuse un défaut de développement des plasmocytes IgG⁺ à longue durée de vie, et au niveau de la muqueuse intestinale un défaut qualitatif des IgA et perturbe ainsi l'homéostasie locale [237, 238].

PD-1 joue aussi un rôle protecteur au niveau de certains sites immuno-préservés telle que le tissu testiculaire [239]. Son rôle dans le maintien de la tolérance materno-fœtale est suggéré par la présence de ses ligands au niveau du placenta [240].

PD-1 apparaît donc comme étant une molécule dotée d'une grande pléiotropie lui permettant de maintenir l'homéostasie immunitaire en agissant par différents mécanismes. Elle se distingue ainsi des autres co-récepteurs tels que le CTLA-4 par sa grande capacité d'influencer le comportement de plusieurs types de cellules immunitaires appartenant aussi bien au compartiment adaptatif qu'inné.

4.2. PD-1 et maladies auto-immunes

De nombreux modèles murins illustrent l'implication directe de PD-1 dans plusieurs maladies auto-immunes expérimentales ayant leurs équivalents humains.

Le tableau suivant présente certains modèles murins pertinents, leurs manifestations auto-immunes respectives ainsi que les maladies auto-immunes humaines correspondantes.

Modèle murin et fond génétique	Tableau auto-immun	Maladie auto-immune humaine correspondante
C57BL/6(B6)-PD-1 (-/-) [162]	« Lupus-Like » avec arthrites et glomérulonéphrite avec dépôt d'IgG3 et de la fraction C3 du complément dans le glomérule	Lupus érythémateux systémique
NOD-Pdcd1-/- [241]	Les souris NOD développent spontanément le diabète auto-immun, le déficit en PD-1 l'accélère et augmente sa fréquence.	Diabète auto-immun de type 1
BALB/c-PD-1-/- [161]	Cardiomyopathie dilatée auto-immune avec dépôt d'IgG au niveau du cardiomyocyte	Cardiomyopathie dilatée auto-immune
Souris C57BL/6 immunisées avec la protéine MOG avec blocage <i>in vivo</i> de la voie PD-1 par un anticorps anti-PD-1 [242]	Exacerbation et installation rapide de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale	Sclérose en plaque
C57BL/6(B6)-PD-1(-/-) immunisées par du collagène type II [243]	Plus grande susceptibilité à la maladie arthritique avec une forme plus sévère	Polyarthrite rhumatoïde

Tableau 2. Les différents modèles expérimentaux illustrant le rôle direct de PD-1 dans le maintien de la tolérance immune

Par ailleurs, l'association de certains polymorphismes du gène de PD-1 avec un plus haut risque de développer certaines maladies auto-immunes est bien documentée chez l'homme. Ce risque est par exemple plus élevé pour le lupus érythémateux systémique, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type I, la sclérose en plaque ainsi que la spondylodiscite ankylosante [244-248]. Une expression anormale ou inappropriée de PD-1 et /ou de ses ligands a également été retrouvé au cours de certaines maladie auto-immunes (tableau 3).

Au cours du lupus érythémateux systémique, certaines études ont montré la présence d'une baisse significative de l'expression basale et inductible de PD-1 sur les lymphocytes T CD4+ et TCD4+CD25+, aussi bien chez les patients que chez les apparentés ayant le polymorphisme PD-1.3A. *In vitro*, cette baisse d'expression serait également associée à un défaut fonctionnel de l'axe PD-1/PD-L qui n'assure plus ses fonction inhibitrices sur la production de l'IFN- γ et la prolifération des lymphocytes T [249].

Outre l'augmentation de l'expression de PD-1 et de ses ligands chez les patients qui souffrent de polyarthrite rhumatoïde (tableau 3), les effets inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 seraient partiellement compromis *in vitro* [243]. De ce fait, PD-1 ne peut pas moduler la réponse immune au cours de la polyarthrite rhumatoïde et ne protège plus contre l'auto-immunité.

Maladie auto-immune	Protéines	cellule
Syndrome de Sjogren [250]	PD-1 ↑	Lymphocyte T
	PD-L1 ↑	épithélium salivaire
Polyarthrite rhumatoïde [243]	PD-1 ↑	Lymphocytes T intra-synoviaux et périphériques
	PD-L1 et PD-L2 ↑	Macrophages intra-synoviaux
Hépatite auto-immunes et cirrhose biliaire primitive [251]	PD-1 ↑	Lymphocytes T
	PD-L1 et PD-L2 ↑	Cellules de Kupffer, cellules endothéliales sinusoidales
Lupus érythémateux systémique [249]	PD-1 ↓	Lymphocytes T CD4+CD25+

Tableau 3. Expression aberrante de PD-1 au cours de certaines maladies auto-immunes chez l'homme

Comme prédit par les modèles animaux, le défaut de fonctionnement de la voie PD-1 semble jouer un rôle dans le développement de certaines maladies auto-immunes chez l'homme. Cependant, un lien direct entre ce défaut et la rupture de la tolérance immune au cours de ces maladies n'est pas encore bien établi.

4.3. PD-1 et infections virales

L'expression transitoire de PD-1 sur les T activés permet d'éteindre la réponse immune une fois l'agression infectieuse est endiguée. Cependant, de nombreux travaux ont montré que PD-1 est non seulement transitoirement induit sur les T activés, mais est également exprimé d'une manière soutenue et prolongée sur les cellules T épuisées (« exhausted T cells ») lors d'une stimulation antigénique chronique. Initialement, PD-1 a été incriminé dans le dysfonctionnement des T CD8 chez la souris infectée de manière chronique par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) [252]. Les fonctions sécrétrices (IFN- γ et TNF- α) et l'expansion des lymphocytes T CD8 antiviraux exprimant PD-1 sont diminuées.

PD-1 a ensuite été impliqué dans le défaut fonctionnel T associé à l'infection chronique par le VIH [253-255], le VHB [256, 257] et le VHC [258-260]. PD-1 est fortement exprimé sur les T CD8 mémoires spécifiques du VIH ou du VHC, alors que son expression est plus faible sur les T mémoires spécifiques d'un virus bien contrôlé (CMV par exemple). Au cours de l'infection par le VIH, l'expression de PD-1 sur les T CD8+ antiviraux est directement corrélée à la charge virale, et inversement corrélée au nombre des lymphocytes T CD4+. L'expression de PD-1 est également associée à une survie diminuée et à un défaut fonctionnel des T CD8+ antiviraux : défaut d'expansion cellulaire et de production d'IL-2, TNF α et IFN- γ [253-255]. PD-1 est donc directement corrélé à la progression de la maladie.

Ainsi, PD-1 semble jouer un rôle majeur dans l'induction de l'épuisement des lymphocytes TCD8 antiviraux. L'expression d'autres molécules inhibitrices telles que LAG3 a un rôle additif et majore le dysfonctionnement observé. Au cours d'une infection virale non maîtrisée, l'épuisement des lymphocytes T CD8 antiviraux se fait d'une manière graduelle et hiérarchisée, allant d'abord de la perte progressive des fonctions sécrétrices puis de la prolifération jusqu'à l'élimination effective par apoptose (figure 15) [261].

De façon intéressante, le blocage de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 (largement exprimé sur les cellules infectées) permet de restaurer ces fonctions effectrices et de revigorer la réponse antivirale [252, 255, 262]. Il est ainsi possible de « ressusciter » les lymphocytes T mémoires et de restaurer leur activité antivirale en neutralisant la molécule PD-1 exprimée à leur surface, ce qui représente une approche thérapeutique prometteuse (figure 16).

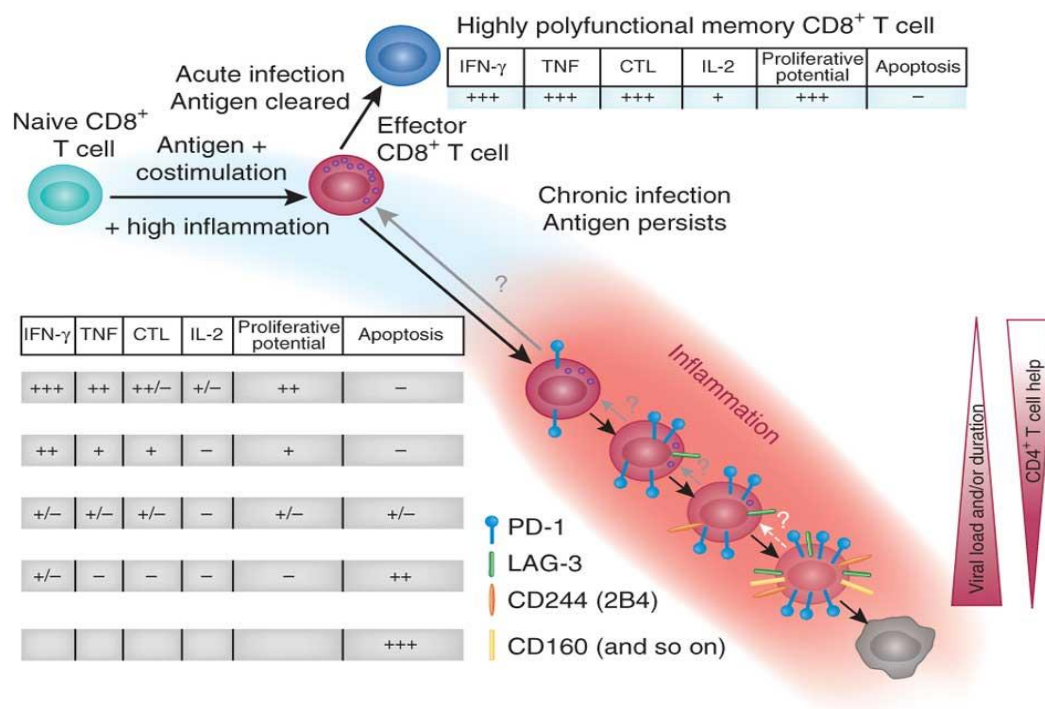


Figure 15. L'épuisement des lymphocytes T effecteurs antiviraux se fait d'une manière progressive et hiérarchisée aux cours d'une infection virale chronique [261].

Outre les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ anti-VIH ont un profil épuisé comparable à celui des T CD8⁺ quant à leur prolifération, leur pouvoir de différenciation et leurs fonctions sécrétrices. De plus, le blocage de la voie PD-1 permet une récupération au moins partielle (selon les études) de ces fonctions [263, 264].

Les lymphocytes B souffrent également de dysfonctionnement au cours de l'infection VIH. PD-1 est surexprimé sur les lymphocytes B périphériques et le blocage *in vitro* de l'interaction de PD-1 avec ses ligands restaure la réponse du lymphocyte B à la stimulation par le VIH-1 inactivé [265].

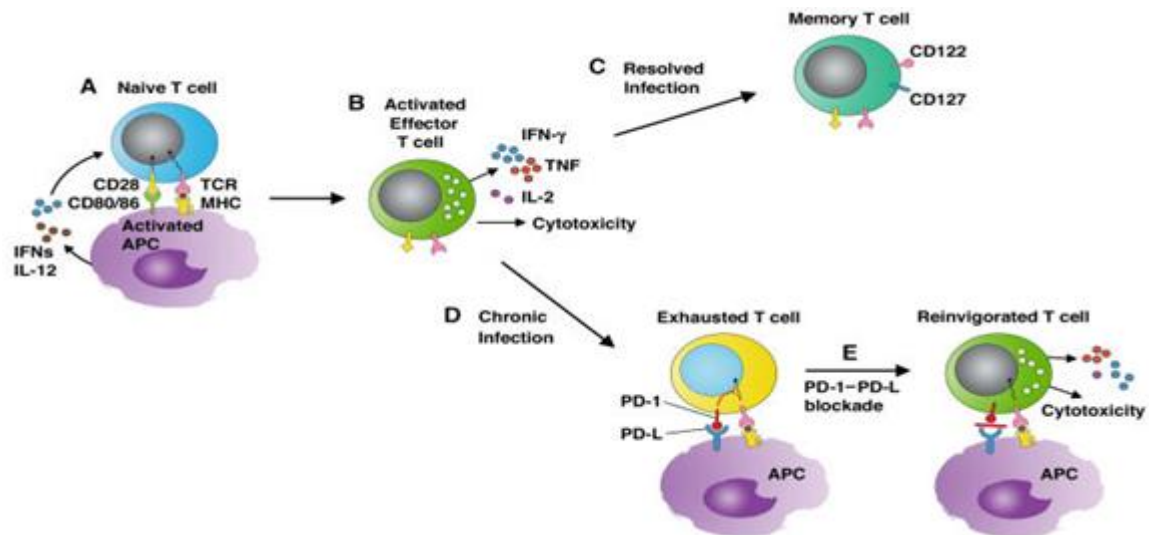


Figure 16. Le blocage de l'axe PD-1/PD-L revigore les cellules T épuisées. (A) les cytokines et/ou les produits produits en réponse à une agression infectieuse activent les cellules présentatrices de l'antigène et induisent l'expression de CD80 et CD86. L'engagement de CD28 par CD80/CD86 stimule l'expansion et la différenciation des T naïfs en T effecteurs. (B) Le lymphocyte T effecteur élimine le pathogène en sécrétant des cytokines et tuant par cytotoxicité les cellules infectées. (C) Une fois l'infection est maîtrisée, les T effecteurs peuvent se différencier lymphocytes T mémoire protecteurs et à longue durée de vie. (D) Cependant, lors d'une infection chronique, ces mécanismes sont défectueux et cellules T leurs fonctions effectrice et leur capacité à proliférer et à se différencier. Elles deviennent fonctionnellement épuisées et sur-expriment PD-1 (E) le blocage d'interactions entre la PD-1 et ses ligands peut revigorer des cellules T pour permettre un regain de leurs fonctions effectrices [266]

PD-L1 est exprimé au niveau du foie, site de répllication virale pour le VHB et le VHC. Cette expression constitue un avantage pour ces virus qui usurpent l'axe PD-1/PD-L et l'utilisent comme stratégie d'échappement à la réponse immune pour pérenniser l'infection. Les effets de l'expression de PD-1 sur les T CD8⁺ antiviraux périphériques au cours de ces deux infections virales sont comparables à ceux retrouvés au cours de l'infection par le VIH, et leurs fonctions sont améliorées *in vitro* par la neutralisation de l'interaction PD-1/PD-L1 [257, 259]. Cependant, les lymphocytes T CD8⁺ anti-VHC intrahépatiques sont encore plus profondément « épuisés » avec une expression de PD-1 et une atteinte fonctionnelle plus prononcées [267, 268]. De plus ils sont réfractaires au blocage de la voie PD-1 [268]. Ces résultats suggèrent que localement, la suppression de la réponse antivirale est encore plus efficace. Ceci pourrait être expliqué par le maintien *in situ* d'une interaction soutenue entre PD-1 et ses ligands,

contrairement aux cellules T périphériques. De plus, il n'est pas exclu que la présence locale d'autres facteurs qui en agissant en synergie avec PD-1, renforcent cet effet suppresseur. En effet, le blocage synergique de la voie PD-1 et de la voie CTLA-4 restaure les fonctions des lymphocytes T CD8+ antiviraux intrahépatiques [269].

Le détournement de l'axe PD-1/PD-L1 semble donc être un mécanisme important d'échappement à la réponse immune au cours des infections virales chroniques. En effet, le VIH semble avoir le pouvoir d'induire et de renforcer une déméthylation prolongée du locus *Pdcd1* les T CD8+ antiviraux [270]. Cette déméthylation maintient le locus accessible et en état « d'éveil » permettant l'expression rapide de PD-1. Ce qui par conséquent permettrait à ce dernier d'exercer ses effets inhibiteurs et de provoquer la terminaison prématurée de la réponse immune et des fonctions antivirales.

La voie PD-1 constitue une cible thérapeutique intéressante pour promouvoir la réponse immune anti-virale. En effet, des essais cliniques en phase I utilisant des anticorps monoclonaux anti-PD-1 ou anti-PD-L1 au cours des infections chroniques par le VHC et VIH respectivement ont déjà été initiés (source www.clinicaltrials.gov).

4.4. PD-1 et pathologies néoplasiques

Il est actuellement bien admis que le microenvironnement tumoral est hautement immunosuppresseur et inhibe localement la réponse anti-tumorale des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL). L'implication de PD-1 dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire a été suggérée par les modèles animaux et à présent confirmé dans différents cancers chez l'homme. De manière générale, les lymphocytes T infiltrant la tumeur expriment PD-1, et les cellules tumorales expriment le ou les ligands (PD-L1 et/ou PD-L2). La mise en jeu *in situ* de l'interaction de PD-1 avec ses ligands inhibe les fonctions cytotoxiques et sécrétrices de cytokines. Ce schéma d'échappement se rapproche de celui des infections virales chroniques. L'expression de PD-L1 et/ou de PD-L2 au sein du tissu tumoral est parfois associée à un mauvais pronostic vital [271-275].

Au cours du mélanome, du carcinome pulmonaire non à petite cellules et du carcinome rénal, PD-1 est surexprimé sur les lymphocytes T Isolés à partir du tissu tumoral. Cette expression est associée à une perte fonctionnelle de ces cellules dont PD-1 serait en partie responsable. Une

forte expression de PD-1 est en effet associée à un défaut de sécrétion de l'IFN- γ et à une faible réponse calcique [191, 276]. Plusieurs autres travaux confirment ces résultats et les retrouvent au cours d'autres tumeurs (cancer de l'ovaire, cancer de l'oropharynx, cancer gastrique). les TIL sont « épuisés » et cet épuisement est fortement corrélé à l'expression de PD-1 [277-281]. Le blocage *in vitro* de l'interaction de PD-1 avec son ligand par un anticorps anti-PD-1 permet de restaurer cette perte de fonction au cours des cancers de l'oropharynx associés aux HPV oncogéniques [280], ce qui pourrait constituer une approche thérapeutique ciblée.

De façon surprenante, l'expression concomitante de PD-1 sur les lymphocytes T infiltrant et celle des ligands sur la tumeur, constituent un facteur de bon pronostic. C'est en effet le reflet d'une réponse immune spécifique anti-tumorale présente et développée, même si elle est réprimée et non efficace en raison de l'activation de l'axe PD-1/PD-L1 (du moins en partie). De plus, ce caractère permettrait de sélectionner des patients potentiellement répondeurs qui pourraient bénéficier d'une approche thérapeutique plus ciblée utilisant le blocage de l'interaction de PD-1 avec ses ligands [280, 282] (figure 17).

Ces nombreuses observations ont conduit à la mise en place de plusieurs essais cliniques visant le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 par des anticorps monoclonaux anti-PD-1 ou anti-PD-L1, dans plusieurs types de cancer (mélanome, cancer gastrique, cancer rénal, pulmonaire, myélome multiple...) [283]. En ce qui concerne par exemple le mélanome, les premiers résultats des essais cliniques utilisant un anti-PD-1 sont spectaculaires avec une bonne tolérance et une amélioration significative de la survie et de la réponse anti-tumorale [284, 285].

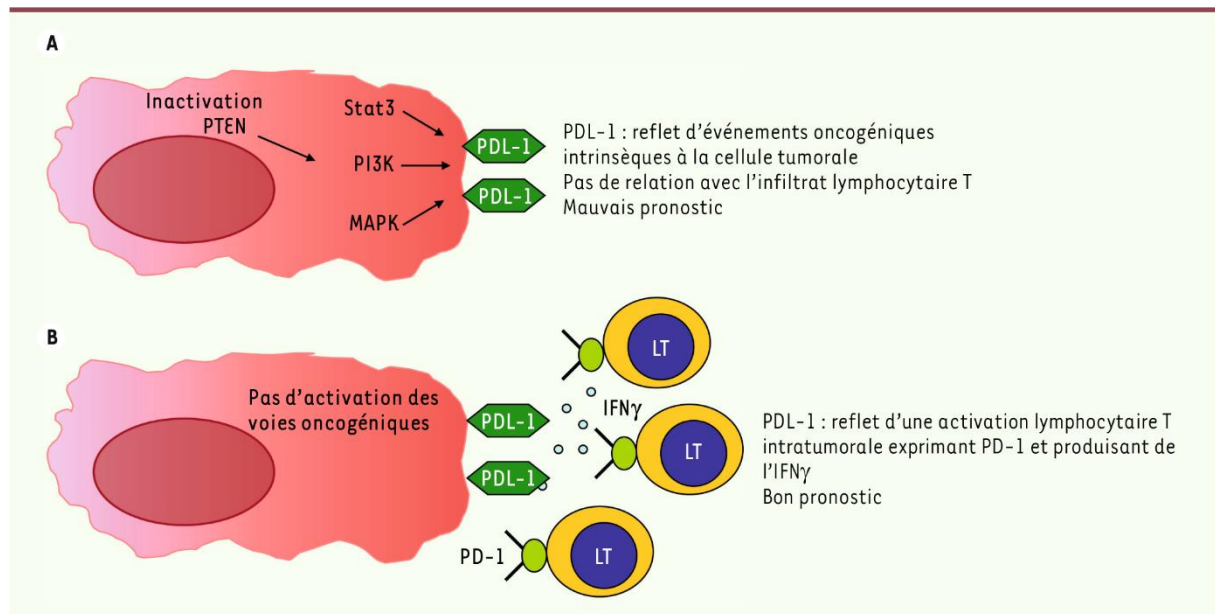


Figure 17. Expression de PDL-1 et PD-1 dans une tumeur : signification et pronostic clinique. A. L'expression de PDL-1 est secondaire à l'activation de différentes voies oncogéniques et non dépendante de l'infiltration par les lymphocytes T (LT). Elle est associée à un mauvais pronostic. PTEN : phosphatase and tensin homolog ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinase. B. L'expression de PDL-1 est liée à la production d'IFN γ par les LT activés infiltrant la tumeur et qui expriment PD-1, reflet de leur activation. PDL-1 et PD-1, dans ce contexte, sont souvent corrélés à un bon pronostic clinique [282].

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Objectifs du travail

L'activation des cellules NK est finement régulée par l'action coordonnée de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Grâce à ce réseau de récepteurs, les cellules NK surveillent leur environnement afin de pouvoir répondre rapidement et éliminer une agression virale ou une transformation tumorale. Cependant, d'autres facteurs interviennent soit pour amplifier cette réponse, soit pour la réguler négativement et la terminer. Au cours des infections virales chroniques ou des processus tumoraux, les stratégies d'échappement viral et tumoral à la réponse immune peuvent utiliser de manière inappropriée certains mécanismes régulateurs afin de réprimer en permanence la réponse immune de l'hôte. L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle que pourraient jouer le récepteur PD-1 et la prostaglandine PGE2 dans la régulation négative des cellules NK, en particulier dans un contexte d'inflammation chronique telle qu'une infection virale chronique ou au cours d'un processus tumoral.

La première partie de ce travail de thèse concerne la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK exprimant le récepteur PD-1 au cours de certaines infections virales chroniques. Les objectifs de ce premier travail étaient les suivants :

1. Déterminer la fréquence de l'expression de PD-1 sur les cellules NK périphériques de patients au cours de différentes infections virales chroniques (HHV-8, VHC, VIH).
2. Déterminer si cette expression est corrélée à certaines caractéristiques clinico-biologiques des patients.
3. Etudier sur le plan phénotypique et fonctionnel la sous-population NK PD-1+ par rapport à la population NK n'exprimant pas PD-1.
4. Définir les facteurs et les circonstances pouvant induire l'expression de PD-1 sur les cellules NK.
5. Analyser les conséquences fonctionnelles de l'expression de PD-1 sur les cellules NK en utilisant un modèle de lignée NK exprimant PD-1 d'une manière stable (technique de transduction lentivirale). Ce système nous permet de nous affranchir des éléments confondant inhérents aux pathologies sous-jacentes.

Cette première partie de travail de thèse nous a permis de proposer un schéma « d'épuisement » des cellules NK au cours des infections virales.

Au cours de la deuxième partie de ce travail nous avons voulu étudier en profondeur l'effet immunosuppresseur de la PGE2 sur les cellules NK, et en particulier l'antagonisme PGE2/IL-15 dans la régulation de l'activation des cellules NK. Nos objectifs étaient de:

1. caractériser l'expression des récepteurs de la PGE2 au niveau des cellules NK au repos, et étudier la régulation de leur expression par la PGE2 et l'IL-15.
2. Déterminer quels sont les récepteurs utilisés par la PGE2 pour s'opposer à l'effet de l'IL-15 et diminuer l'expression de NKG2D et de l'IL-15R γ .
3. Quantifier le niveau de production de la PGE2 par les cellules NK au repos ou après stimulation, afin de déterminer la présence d'un possible effet autocrine de la PGE2 sur les cellules NK.
4. Etudier l'expression de COX-1 et COX-2 par les cellules NK au repos ou en réponse aux effets de la PGE2 et/ou de l'IL-15. Le but étant de déterminer si la production de la PGE2 peut-être régulée en amont, au niveau même des molécules COX.

Cette deuxième étude nous a permis de dégager un profil de régulation de l'activation des cellules NK, intégrant les effets antagonistes de la PGE2 et de l'IL-15.

RESULTATS

**ETUDE 1 : EXPRESSION DE PD-1 SUR LES
CELLULES NK : CONSEQUENCES
PHENOTYPIQUES ET FONCTIONNELLES**

PD-1 expression mediates functional exhaustion of persistently activated mature NK cells in patients with chronic viral infections

Asma Beldi-Ferchiou (1), Marion Lambert (1), Stéphanie Dogniaux (2), Stéphanie Dupuy (1), Frank Levasseur (1), Daniel Olive (3), David Zucman (4), Céleste Lebbé (5), Damien Sène (1,6), Claire Hivroz (2) and Sophie Caillat-Zucman (1,7)

Author Affiliations

(1) Institut national de recherche médicale (INSERM) UMR1149, Centre de Recherche sur l'Inflammation ; Université Paris Diderot, Paris, France

(2) Institut Curie, Centre de Recherche, INSERM U932 Immunité et Cancer, Paris, France

(3) Centre de Cancérologie de Marseille, Equipe Immunité et Cancer, INSERM U1068; Institut Paoli-Calmettes; Aix-Marseille Université, UM 105; CNRS, UMR7258

(4) Hôpital Foch, Service de Médecine Interne, Suresnes, France

(5) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Saint-Louis, Département de Dermatologie ; INSERM U976; Université Paris Diderot, Paris, France

(6) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Lariboisière, Département de Médecine Interne, Paris, France

(7) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Robert Debré, Laboratoire d'Immunologie, Paris, France

Correspondence to: Professeur Sophie Caillat-Zucman

INSERM UMR1149, Team "Innate immune responses in the child"

Hôpital Robert Debré

48 Bd Sérurier

75019 Paris- France

email : sophie.caillat@inserm.fr

Running Head: PD-1 and NK cell exhaustion

Total number of characters: 39056

ABSTRACT (196 words)

Natural Killer (NK) cells are innate lymphocytes that play an important role in the control of viral infections and tumors. Their reactivity is governed by signals arising from activating and inhibitory receptors, which ultimately determine the magnitude of NK-cell mediated functions. Programmed Death-1 (PD-1), an inhibitory receptor expressed by activated lymphocytes, is involved in regulating T and B cell responses. PD-1 and its ligands have been exploited by a variety of microorganisms to attenuate antimicrobial immunity and facilitate chronic infection. We found that PD-1 was expressed on a fraction of activated mature CD56dim CD16+ NK cells with decreased NKp46 levels in patients with chronic viral infections. PD-1 expression was induced on control cells by in vitro triggering of the NKp30 or NKp46 activating receptors in the presence of IL-2 or IL-15. PD-1-expressing cells were highly dysfunctional with respect to cytotoxicity and cytokine production. That PD-1 directly contributed to NK cell functional impairment and was not simply a marker of dysfunctional NK cells was confirmed in PD-1-transduced NKL cells. Thus, PD-1 appears to play a critical role in mediating exhaustion of NK cells during chronic viral infections upon persistent exposure to ligands of activating receptors and inflammatory mediators.

INTRODUCTION

Natural Killer (NK) cells play an important role in the control of viral infections and cancer. Their reactivity is governed by a balance of activating and inhibitory receptors, which ultimately determine the magnitude of NK-cell mediated cytotoxicity and cytokine production. Because NK cells are potent effector cells when activated, their activation must be tightly regulated to avoid uncontrolled inflammation and limit pathology [34, 286, 287]. Furthermore, viruses have developed multiple strategies to interfere with NK-cell mediated functions with the goal of evading immune elimination of infected cells. This is particularly evident in HIV or HCV-infected individuals, whose NK cells undergo numerous phenotypic and functional changes [288-290].

PD-1 is a key immune checkpoint receptor expressed by activated T, B, myeloid and NKT cells [169, 170, 172, 174, 175, 291]. Two ligands are currently known for PD-1: PD-L1 (B7-H1), which is constitutively expressed on macrophages, dendritic cells and lymphocytes, and PD-L2 (B7-DC), inducibly expressed on many different cell types [172, 187, 188]. Binding of PD-1 with one of its ligands induces functional inhibition mediated by the dephosphorylation of different activating signaling pathway proteins [171, 188, 209-212]. Thus, ligation of PD-1 on T cells inhibits their activation, proliferation and cytokine production, and ultimately results in T lymphocyte inhibition, coined as exhaustion.

Modulation of expression of PD-1 and its receptors has been implicated in numerous settings involving persistent antigen stimulation, such as those derived from chronic infections and cancer. Expression of PD-1 by exhausted virus-specific T cells that are characteristic of chronic viral infections prevents the proliferation and function of effector T cells and clearance of the virus [253-255]. In the early phase of acute viral infection, PD-1 expression is significantly but transiently upregulated on virus-specific CD8 T cells, and successful viral clearance correlates with subsequent decrease in PD-1 expression [292]. At contrast, PD-1 is persistently upregulated by virus-specific CD8 T cells during chronic infections, and this contributes directly to T-cell dysfunction and poor control of viral replication [254, 255, 292, 293]. Thus, in addition to its utility as a marker for dysfunctional T cells in chronic viral infections, its dependence on ongoing antigenic stimulation potentially renders PD-1 a sensitive indicator of persistent, low-level viral replication. Importantly, blocking the PD-1 signaling pathway results in reinvigoration of exhausted CD8 T cell's immune responses [255, 258, 293]. Recently, PD-1 pathway inhibitors were demonstrated to have a profound positive effect on late stage cancers, including cases of complete cure [294, 295]. Whether such therapeutic

approach may also improve T cell function in patients with HCV, HIV or HBV chronic viral infection is currently under investigation (clinicaltrials.gov).

In the course of analyzing the contribution of NK cells to immunosurveillance of the oncogenic Human Herpes Virus 8 (HHV8), we previously reported substantial alterations of the NK cell receptor repertoire and NK cell functions in chronically infected individuals, adding HHV8 to the list of persistent viruses mediating severe NK cell changes [83]. Moreover, we fortuitously detected a subset of mature NK cells expressing the PD-1 regulatory molecule in patients who developed HHV8-associated Kaposi sarcoma (KS). Although PD-1 expression on NK cells was previously reported in a few other settings [296-298], phenotype characteristics of PD-1 expressing NK cells and functional consequences of PD-1 expression in NK cells have not been evaluated in depth. Here, we show that PD-1 expression characterizes a population of mature, activated NK cells with strongly altered functional capacities, observed at elevated frequencies in patients with chronic viral infections. We speculate that PD-1 expression on NK cells is a consequence of persistent stimulation by chronic exposure to ligands of activating receptors in the presence of inflammatory mediators. By analogy with CD8 cells, expression of PD-1 on NK cells may signify functional exhaustion, possibly as a result of so far undetected persistent, low-level viral replication.

RESULTS

PD-1 is expressed on a fraction of NK cells in patients with chronic viral infections

We fortuitously detected a subset of CD3⁺ CD56^{dim} NK cells expressing the PD-1 regulatory molecule in patients who developed Kaposi sarcoma (KS), that was barely detectable in healthy controls (mean proportion of PD-1^{pos} cells among NK cells: 4.0% in KS patients, range 0.2-23.4%; and 0.5% in controls, range 0.1-2.4%, $P < 0.0001$) (Figure 1A). The presence of PD-1^{pos} NK cells was not related to the presence or absence of HIV co-infection in KS patients (mean 3.0% in HIV-associated KS and 4.4% in classical KS, ns). In addition, we observed PD-1^{pos} NK cells in HHV8 asymptomatic carriers with or without HIV co-infection, although at a lower frequency than in KS patients (mean 2.0%, range 0.15-11.3%, $P = 0.0001$ compared to controls). We also found an increased frequency of PD-1^{pos} NK cells in HHV8-

negative HIV+ patients (mean 2.1%, range 0.17-12.6%, $P = 0.0005$ compared to controls) (Figure 1B). Importantly, all HIV+ subjects (HHV8+ or -) were HIV-aviremic under antiretroviral treatment (ART).

Expression of PD-1 on CD56^{bright} NK cells was previously reported in patients with chronic hepatitis C [296]. We therefore, analyzed a series of HCV chronically infected patients, including treatment naïve viremic patients and IFN α /ribavirin-treated patients with sustained viral response, with or without ART-treated HIV co-infection. We found that the proportion of PD-1^{pos} NK cells was quite low in HCV patients (mean 1.3% in HIV-negative versus 1.6% in co-infected patients, $P = 0.001$ compared to healthy controls), whatever they were HCV treatment naïve or responders (Figure 1B).

Because the proportion of PD-1^{pos} NK cells showed a considerable inter-individual heterogeneity, accounting for more than 20% of NK cells in some patients, we wondered if this variability might be attributed to disease-associated clinical or biological characteristics. No association was found between the frequency of PD-1^{pos} NK cells and age, gender, geographic origin, nor with duration or severity of the underlying viral disease (active versus resolved KS, stage of HCV liver disease, CD4 T cell count or CD4 nadir in HIV patients). At variance with the known inverse relationship between PD-1 expression on virus-specific T cells and HIV or HCV viral load, there was no correlation between PD-1 expression on NK cells and detectable HHV8 viremia, or HCV load ($r = 0.09$, $P = 0.68$). In addition, as mentioned above, all HIV+ patients were aviremic at time of study, excluding a potential effect of HIV load.

The percentage of PD-1^{pos} NK cells was stable over the time, as shown by repeated analysis over 4-years follow-up in some patients, indicating that expansion of PD-1^{pos} NK cells was not related to an acute infection episode. We observed a slight but significant correlation between the percentage of PD-1^{pos} NK cells and PD-1+ CD8 T cells in the whole patient group ($r = 0.28$, $P = 0.01$, Figure 1C). We thus speculated that expression of PD-1 on NK cells might be related to other blood-born persistent viral infection in which elevated proportions of PD-1+ T cells have been described, such as infection by Epstein Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) or hepatitis B virus (HBV). The frequency of PD-1^{pos} NK cells was not correlated with EBV viral load ($r = -0.06$, $P = 0.8$), and was not associated with the presence of CMV-specific IgG or HBV markers (not depicted). Elevated levels of circulating microbial products, probably related to impaired mucosal barrier function in the gut, were reported to be responsible for the upregulation of PD-1 on monocytes in HIV patients [299]. We thus measured LPS and soluble CD14 levels in patients' sera as indicators of microbial translocation, but found no correlation with PD-1 expression on NK cells ($r = -0.15$, $P = 0.44$ and $r = 0.14$, $P = 0.42$, respectively).

Altogether, these results show that PD-1 is expressed in a subset of NK cells in some patients with chronic viral infection, in particular HHV8 infection, without clear relationship between traditional measures of viral disease progression and the proportion of PD-1^{pos} NK cells.

PD-1 expression characterizes activated mature NK cells

PD-1 is expressed on activated T cells and functionally exhausted memory T cells. To determine if PD-1 expression on NK cells depends on a particular state of activation or maturational status, we measured frequencies and expression levels of a range of activation, differentiation and proliferation markers on PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells (Figure 2A).

We found that PD-1 expression was always restricted to the mature CD56^{dim} CD16⁺ NK cell subset, at variance with the previously reported expression of PD-1 on the more immature CD56^{bright} NK cell subset in HCV patients [296]. Compared to their PD-1^{neg} counterpart, PD-1^{pos} NK cells showed higher expression of the CD69 (mean MFI 307 in PD-1^{pos} versus 197 in PD-1^{neg} NK cells, $P = 0.002$) and CD25 (mean MFI 102 vs 74, $P = 0.007$) activation markers. They also expressed higher levels of Nkp44 (mean MFI 118 vs 79, $P = 0.002$), a natural cytotoxicity receptor (NCR) induced on NK cell surface upon activation. Although intracellular perforin levels were similar in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} cells, the PD-1^{pos} population showed some spontaneous degranulation, as assessed by expression of cell surface CD107a (mean 5.2% of PD-1^{pos} versus 2.0% of PD-1^{neg} NK cells, $P = 0.007$). Expression of the PD-1 cognate ligands, PD-L1 and PD-L2, was similar in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells.

To determine if expression of these activation markers actually mirrored in vivo proliferation, we analyzed NK cells for the expression of Ki67, a protein associated with cell-cycle progression and generally used as a marker of continued proliferation. Ki67 expression was low and comparable in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells (mean 3.9% of PD-1^{pos} versus 2.3% of PD-1^{neg} NK cells, ns). CD57, a marker of CD56^{dim} late differentiation [300], was suggested to mark memory-like NK cells that have been expanded in response to infection [301]. We found a similar proportion of PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells expressing CD57 (mean 61.9% of PD-1^{pos} versus 55% of PD-1^{neg} NK cells, ns). We also analyzed expression of KLRG1, a marker of post-mature NK cells having undergone proliferation [302, 303]. Because commercial antibodies did not provide reliable KLRG1 staining on NK cells, we quantified KLRG1 mRNA levels in sorted PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells, and found no difference between the two populations (relative mRNA levels 2.07 versus 2.6, ns). Lastly, we observed that PD-1

expression was associated with a higher sensitivity of NK cells to spontaneous apoptosis, estimated by annexin V surface exposure (mean 12.3% of PD-1^{pos} versus 3.1% of PD-1^{neg}, P= 0.002).

Our data therefore indicate that PD-1 expression defines a sub-population of activated, non-cycling, mature NK cells with increased apoptosis sensitivity, but is independent of their terminal maturation and proliferation state.

Surface expression of NK cell receptors often corresponds to NK differentiation and function [13]. Therefore, we examined the expression patterns of several activating and inhibitory receptors in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells (Figure 2B). There was no difference in the expression of whole KIRs (monitored by a cocktail of antibodies to KIR2DL1/S1, KIR2DL2/L3/S2, KIR3DL1/S1, KIR2DS4), NKp30, NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKp80, CD161 and DNAM-1. In particular, PD-1^{pos} cells did not correspond to an expanded and persistent population of NK cells bearing the NKG2C receptor that has been described after infection by human CMV [304], as checked in 5 CMV+ healthy controls (not depicted). However, we observed that PD-1^{pos} cells had much lower levels of the activating NKp46 receptor, another member of the NCR family involved in anti-tumor and anti-viral responses (mean MFI 493 in PD-1^{pos} versus 805 in PD-1^{neg} NK cells, P= 0.01) (Figure 2B, C).

PD-1 expression on NK cells is induced by cytokines and NCR stimulation

To understand the mechanisms contributing to accumulation of PD-1^{pos} NK cells in some patients, we tried to identify factors able to induce PD-1 in vitro on control NK cells. We first assessed the expression of PD-1 following non-specific activation (Figure 4A). PD-1 expression was strongly induced after 12 hours of stimulation with PMA plus ionomycine (mean percentage of PD-1^{pos} NK cells: 14%) (Figure 3A), after which most PD-1^{pos} NK cells became apoptotic and died.

We next cultured PBMCs for 1 to 6 days with increasing doses of cytokines known to modulate NK cell proliferation, activation and/or effector functions, after which PD-1 expression was evaluated in parallel on NK and T cells. IL-15, IL-12 and/or IL-18, IL-21, IFN γ or IFN α had no reproducible effect (data not shown). Only IL-2 dose-dependently induced PD-1 on NK cells, but always much lower than on T cells (Figure 3B).

The higher frequency of PD-1^{pos} NK cells in HHV8+ individuals who developed KS compared to asymptomatic HHV8 carriers suggested us that factor(s) associated with tumor development or progression might be involved. We thus assessed expression of PD-1 following

PBMC stimulation with pro- or anti-inflammatory molecules, growth factors or angiogenic factors previously demonstrated to play a role in KS pathogenesis, such as IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF β , VEGF or PGE2. We also determined if pathogen-associated molecules might induce PD-1 by stimulating PBMCs with agonists to TLR3 (poly(I:C)), TLR4 (LPS), TLR7/8 (R848) or TLR9 (CpG ODN 2006). None of these factors induced PD-1 expression on NK cells. Incubating NK cells with the serum of patients exhibiting high frequency of PD-1^{pos} NK cells did not demonstrate any effect, nor did culturing NK cells with HHV8-latently infected endothelial cells or KS-derived cells [83] (data not shown).

Prolonged antigen-specific stimulation of the TCR maintains PD-1 expression on T cells. We thus wondered if triggering of NK cell activating receptors that recognize ligands expressed on infected or tumor cells could induce PD-1. As surrogate, we stimulated NK cells for 72 hours with plate-bound NKp30, NKp46 or CD16 antibodies, or their respective isotype control, in the presence of low dose of IL-2 or IL-15. As shown in Figure 3C, triggering of the NKp30 or NKp46 receptors, but not of CD16, reproducibly induced PD-1 expression on NK cells. Engagement of the NKG2D receptor by immobilized recombinant MICA molecules [305] had no effect (not depicted).

Sustained expression of ligand for activating NK cell receptor may induce downregulation of the receptor. To determine whether persistent stimulation of NKp30 or NKp46 receptors by their respective ligands in vivo might be associated with PD-1 expression on NK cells, we correlated their expression in the whole chronically infected patient group. Interestingly, percentages of PD-1^{pos} NK cells were inversely correlated with percentages of NKp46 or NKp30 NK cells ($r = -0.41$, $p = 0.017$; and $r = -0.35$, $p = 0.039$, respectively), but not with NKG2D levels (Figure 3D).

Altogether, our results indicate that engagement of NKp30 or NKp46 in the presence of IL-2 or IL-15, i.e. a condition mimicking persistent stimulation by infected or tumor cells expressing NCR ligands, may induce expression of PD-1 on NK cells.

PD-1 expression inversely correlates with T-bet expression

In CD8 T cells, PD-1 expression is regulated at the level of transcription. To further decipher the mechanisms involved in PD-1 expression in NK cells, we analyzed expression of transcription factors involved in peripheral NK cell maturation and function. Quantitative RT-PCR analysis showed comparable T-bet, Blimp-1 and GATA3 mRNA levels in sorted PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells (Figure 4A). T-bet was previously shown to repress PD-1 expression, and

accordingly T-bet expression inversely correlated with PD-1 expression in antiviral CD8 T cells [184]. We therefore, wondered if more subtle differences of T-bet expression might be evidenced by flow cytometry experiments. While intracellular staining showed overall similar T-bet levels in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells (Figure 4B), we observed that a fraction of NK cells expressed PD-1 at very high levels, and interestingly these PD-1⁺⁺ cells were T-bet-negative, whereas all other NK cells (PD-1⁺ and PD-1^{neg}) strongly expressed T-bet (Figure 4C). These results suggest that T-bet might regulate PD-1 expression in NK cells.

PD-1 expression identifies dysfunctional, exhausted NK cells

Expression of PD-1 on T cells renders them dysfunctional or exhausted. Therefore, we compared the functional capacity of PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells, as assessed by degranulation (cell surface expression of CD107a) and intracellular accumulation of IFN γ upon specific stimulation by HLA-class I-deficient targets (K562 cells) or NCR triggering (plate-bound NKp30 or NKp46 mAbs), or upon non-specific activation by PMA plus ionomycin (Figure 5A, B). As mentioned above, a fraction of unstimulated PD-1^{pos} NK cells spontaneously expressed CD107a. However, compared to their PD-1^{neg} counterpart, PD-1^{pos} NK cells responded much less efficiently to all conditions of stimulation. This was reflected by a lower increase of surface CD107a after stimulation by K562 targets or plate-bound NKp30 or NKp46 ($P = 0.03$ for all). Similarly, IFN γ accumulation was much lower in PD-1^{pos} than in PD-1^{neg} NK cells following NKp30 or NKp46 triggering ($P = 0.03$), but difference did not reach significance following stimulation with K562 cells. Even upon strong non-specific stimulation by PMA plus ionomycin, PD-1^{pos} NK cells showed a poorer capacity than PD-1^{neg} NK cells to degranulate ($P = 0.01$) and produce IFN γ ($P = 0.03$). Altogether, these results indicate that PD-1 expression characterizes hypofunctional NK cells.

To determine if exogenous cytokines could restore functional abilities of PD-1^{pos} NK cells, PBMCs were preincubated overnight with IL-15 (50 ng/ml) or IL-2 (100 U/ml) before NCR triggering, and processed as above. Notably, both cytokines reinvigorated the capacity of PD-1^{pos} NK cells to degranulate and produce IFN γ to levels comparable to those of PD-1^{neg} cells (Figure 5C). That PD-1^{pos} NK cells maintain cytokine responsiveness further suggests that they are exhausted rather than senescent cells.

None of the above stimulating conditions involved engagement of the PD-1 receptor by its cognate ligands (as K562 cells do not express PD-L1 nor PD-L2, data not shown). To more directly evaluate the involvement of PD-1 in NK cell functional defect, we next examined the

consequences of PD-1 engagement in PD-1^{pos} cells. In these experiments, we cultured PBMCs with the Fc-receptor-bearing P815 target cells in the presence or absence of anti-CD16 agonist antibody and PD-L1-Fc chimeric molecule, and monitored the appearance of CD107a on the cell surface of PD-1^{neg} and PD-1^{pos} NK cells (Figure 5 D). As expected, PD-1^{neg} cells strongly degranulated following CD16 triggering, and this response was not modified by the addition of PD-L1-Fc. By contrast, PD-1^{pos} NK cells were unable to significantly respond to stimulation via the CD16 receptor. However, engagement of PD-1 by PD-L1-Fc did not further inhibit CD107a expression. The lack of PDL1-Fc inhibitory effect was further confirmed by reiterating stimulation experiments with plate-bound NKp30 or NKp46 mAbs in the presence of PDL1-Fc (data not shown). Altogether, these results suggest that PD-1 expression marks highly dysfunctional or exhausted NK cells, and PD-1 engagement by its ligands may not be required for the observed functional defect.

PD-1 expression inhibits NK-cell effector functions.

To further determine if the impaired functions of PD-1^{pos} NK cells result from the expression of PD-1 itself, or whether the two phenomena are indirectly linked, we transduced NKL (a human IL-2 dependent NK-cell line) with a PD-1 lentiviral construct. Stable PD-1 expression was obtained and maintained up to 45 days (Figure 6A). Of note, lentiviral infection by itself did not induce PD-1 expression in NK cells. Moreover, PD-1+ NKL cells did not show impaired proliferative capacity in the usual conditions required for NKL growth (i.e. 100 U/ml of IL-2), indicating that PD-1 expression does not confer NK cell growth disadvantage.

Since PD-1^{pos} NK cells from patients showed expression of activation markers, spontaneous sensitivity to apoptosis and decreased expression of NKp46, we first evaluated if these characteristics were linked to PD-1 expression. We observed no significant difference in the expression of CD69, CD25, NKp44, NKp46, CD107a, Ki67 and annexin V between non-transduced, control- and PD-1-transduced NKL cells. A small expression of PD-L1 was observed on PD-1-transduced NKL cells compared to both non-transduced and control-transduced cells (Figure 6B).

We next analyzed if stable expression of PD-1 in NKL cells rendered them dysfunctional, as assessed by CD107a degranulation upon stimulation by K562 targets or PMA plus ionomycin. Compared to control-vector transduced NKL cells, PD-1-transduced NKL cells showed a small but not significant decrease in CD107a expression in both stimulation conditions. However, because NKL cells were maintained in the presence of 100 U/ml of IL-2,

we wondered if such high dose cytokine exposure might mask PD-1-mediated inhibition, as observed above in cytokine-activated PBMCs. Similar experiments were thus repeated in transduced NKL cells 48 hours after IL-2 withdrawal from the culture medium. In such condition of IL-2 deprivation, K562 cell stimulation was inefficient in both control-vector and PD-1+ NKL cells. Following stimulation by PMA plus ionomycin however, CD107a degranulation was dramatically decreased in PD-1+ NKL cells compared to control-vector NKL cells (mean CD107a+ cells 20% of PD-1+ and 40% of control-vector NKL, $P = 0.007$) (Figure 6C). Collectively, these results indicate that PD-1 expression in NK cells directly contributes to their functional impairment. PD-1 engagement by its ligands does not appear to be required for this functional defect, although we cannot exclude homotypic receptor ligation due to the small expression of PD-L1 observed on PD-1-transduced NKL cells. Together with the observation that PD-1^{pos} NK cells exhibited an activated phenotype in chronically infected patients, these results demonstrate that PD-1 represents a mediator of functional exhaustion in a fraction of persistently activated NK cells, and is not simply a marker of dysfunctional NK cells.

DISCUSSION

T cell exhaustion often occurs during chronic viral infections and prevents optimal control of viral replication. PD-1 has recently emerged as a key inhibitory receptor negatively regulating the function of exhausted T cells [253-255, 258, 268]. Blocking the PD-1 pathway in vitro or in vivo revives exhausted CD8 T cells in chronically infected mice, primates and humans, identifying this pathway as a key therapeutic target [252, 255, 258, 293, 306]. Here we show that PD-1 expression also characterizes a population of exhausted mature NK cells in some patients with chronic viral infection such as HHV8, and to a lower extent HCV or HIV infection.

The presence of PD-1-positive NK cells during chronic infections was already reported, although there were notable differences between our findings and previous studies. Large expansions of CD56^{bright} NK cells were observed in patients with chronic HCV infection, particularly in treatment non-responders [296], and in patients with active tuberculosis [297]. PD-1 expression was detected in more than 30% of both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells in

thoracic transplant children with EBV-associated lymphoproliferative disorders, but was also found in 15% of healthy controls [298]. At contrast, we found that PD-1 expression was always confined to the CD56^{dim} NK cell population, was not more frequent in treatment non-responders than in patients with sustained viral response and was not detected in healthy controls. Such discrepancies may be related to technical issues, such as usage of distinct PD-1 mAbs or staining strategy. Indeed, different anti-human PD-1 clones have been shown to detect high and/or intermediate PD-1-positive cells [268]. Of note, the clone (M1H4) used in our study targeted cells with high rather than intermediate PD-1 expression. Moreover, because non-specific staining frequently occurred with FITC-conjugated PD-1 mAb, we always used a two-step staining strategy and expressed our results as PD-1-specific staining, after subtracting relative isotype control values. Although the clone and staining strategy were not mentioned in other reports, it would be interesting to explore the potential difference between PD-1 intermediate and high NK cells in future studies.

In mice, PD-1 can be induced by various inflammatory factors including IL-2, IL-18, IFN γ and agonists of TLR [307]. Moreover, PD-1 expression is rapidly enhanced on mice NK cells after acute infection by murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) or cytomegalovirus (MCMV) [308, 309]. Among several cytokines and inflammatory molecules tested, we found high dose IL-2 was the only factor that significantly induced PD-1 expression *in vitro* on control NK cells, as previously reported [310]. PD-1 expression was stable over several years on patients' NK cells, making unlikely that it was related to concomitant acute infection. In addition, PD-1^{pos} NK cells were not related to the NKG2C⁺ NK cell population that preferentially responds to acute CMV infection and persists after primary infection [301], nor did they correspond to a memory-like NK cell population.

We found that patients' PD-1^{pos} NK cells had an activated phenotype (as shown by increased expression of CD69, CD25, NKp44 and CD107), and downregulated the NKp46 activating receptor. This suggested that NK cells might express PD-1 upon continued encounter with (infected) target cells that express ligands for NKp46. Indeed, *in vitro* triggering of NKp46 in the presence of IL-2 or IL-15 significantly induced PD-1 on control NK cells. Moreover, the proportions of PD-1 and NKp46 expressing NK cells were inversely correlated in patients, supporting the hypothesis that persistent PD-1 expression on NK cells might be a consequence of chronic immune activation due to subclinical pathogen invasion or reactivation. While PD-1 is expressed on CD8 T cells when viral replication is poorly controlled, we found no evidence for the presence of bacterial products or viral reactivation in patients with PD-1^{pos} NK cell expansions. Unfortunately, quantification of CMV viral load was not performed in our patients,

leaving open the possibility that sustained CMV replication may induce PD-1 on NK cells. NCRs have been shown to recognize a broad spectrum of ligands ranging from viral-, parasite- and bacterial-derived ligands expressed on infected cells, to cellular ligands such as heparan sulfate proteoglycans which are upregulated on cancer cells [49, 311]. NKp46 interacts with hemagglutinin of influenza and vaccinia viruses [49, 76, 312]. It also recognizes vimentin expressed on *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes [313]. In addition to recognizing the B7-H6 ligand on human tumor cells [67], NKp30 can mediate direct recognition of the fungal pathogens *Cryptococcus* and *Candida* [80], suggesting that persistent stimulation of NCRs by fungal antigens might also be involved in PD-1 induction on NK cells. While fungal infections are frequently seen in patients with chronic HIV or HCV infection, their potential relationship with the presence of PD-1^{pos} NK cells could not be investigated in the present study. Infection by herpes simplex virus, which directly activates NK cells in recurrent herpetic skin lesions [314], was unlikely to be involved, as its high prevalence in the general population should be associated with the presence of PD-1^{pos} NK cells in otherwise healthy controls. Finally, PD-1 may also be induced upon persistent NK cell stimulation by cancer cells, as shown by large expansions of PD-1^{pos} NK cells observed in patients with multiple myelomas [310]. Although we found higher frequency of PD-1^{pos} NK cells in patients who developed KS than in asymptomatic HHV8 carriers, we observed no difference between patients with active versus resolved KS. Furthermore, the long-term follow-up of our study patients makes unlikely the possibility of undetected asymptomatic cancer cells persistently stimulating NK cells.

Similar to chronically activated CD8 T cells, PD-1^{pos} NK cells from infected patients showed characteristics of functional exhaustion. Although a fraction of non-stimulated cells spontaneously expressed CD107, they were hyporesponsive to stimulation through activating NCRs. Importantly, this functional defect was not related to the NKp46 activating receptor displaying reduced surface expression on PD-1^{pos} cells, as it also affected stimulation through NKp30, the expression of which was not reduced on these cells. In addition, the expression of PD-1 on transduced NKL cells did not influence the expression of activating receptors, further indicating that PD-1 impedes NK-cell mediated immunity by directly inhibiting cytolytic function rather than by altering the expression of other receptors. By analogy with PD-1+ CD8 cells, the presence of PD-1 on NK cells may thus signify exhaustion of these cells as a result of overstimulation by chronic exposure to ligands and inflammatory mediators. PD-1 would thus characterize a subset of NK cells that adapt to persistent antigen stimulation by upregulating the PD-1 inhibitory receptor and turning off their responsiveness to stimulating conditions.

Importantly, overnight stimulation with IL-15 or IL-2 reinvigorated the capacity of PD-1^{pos} NK cells to degranulate and produce IFN γ , indicating that they maintained their cytokine responsiveness and were not senescent cells. An important implication of this functional reversibility is the possibility that pharmacological agents that block PD1 signaling might enhance not only T cell functions, but also improve the functionality of NK cells in chronic infections or tumors. Indeed, a PD-1 blocking antibody was recently shown to potentiate NK cell-mediated cytotoxicity against autologous primary multiple myeloma cells in vitro [310].

T-bet is a transcriptional repressor which regulates the exhaustion of CD8 T cells and directly represses transcription of the PD-1 gene by binding to upstream regulatory elements [184]. Persistent antigenic stimulation, such as chronic viral infection, drives downregulation of T-bet, which results in more severe exhaustion of CD8 T cells [184]. We found that high PD-1 expression on NK cells was accompanied by strong downregulation of the T-bet transcription factor, while virtually all mature NK cells expressed T-bet. Interestingly, NK cells from T-bet-deficient mice showed an activated phenotype, spontaneous apoptosis and impaired effector functions [315]. Although TCR signaling is necessary for the initiation of T-bet induction, prolonged TCR stimulation leads to downregulation of T-bet in the presence of persistent inflammation [184]. Indeed, in murine tumor models, adoptively transferred NK cells trafficking to tumor downmodulate activating receptors, become functionally exhausted, and show downregulation of T-bet [316]. Taken together, these data suggest that during chronic viral infection, persistent stimulation of NCRs in the presence of inflammatory cytokines may lead to the loss of T-bet expression in NK cells, underlying at least in part increased expression of PD-1 and NK cell exhaustion. Other factors might influence PD-1 expression in NK cells. Thus, during chronic virus infection, prolonged TCR signaling is accompanied by loss of DNA methylation of the PD-1 gene regulatory region in exhausted CD8 T cells [317]. However, our attempt to induce PD-1 expression in NK cells by the DNA demethylating agents azacytidine or decitabine was unsuccessful (data not shown). Finally, cooperative interactions with neighboring transcription factors involved in modulation of NK cell responsiveness to chronic stimulation, such as Eomes and Ets1, should be investigated.

Whether PD-1 engagement by its ligands is required for NK cell functional defect remains an open issue. Very small amounts of PD-L1 on neighboring PD-1^{neg} NK cells, or on PD-1^{pos} cells themselves, may be sufficient to induce PD-1 receptor ligation. Consequently, PD-1 may directly limit NK cell activation by attenuating activating receptor signaling. Alternatively, PD-1 may act by upregulating genes in exhausted NK cells that impair their function. In HIV-specific CD8 T cells, PD-1 upregulated BATF, a transcription factor in the AP-1 family, and

enforced expression of BATF was sufficient to impair T cell proliferation and cytokine secretion [318]. Whether PD-1 coordinately upregulates a program of genes in NK cells is currently under investigation by analyzing gene expression profiles from PD-1-transduced NKL cells.

In conclusion, we show that PD-1 represents a mediator of functional exhaustion in NK cells that have been subjected to chronic stimulation by persistent exposure to cognate NCR ligands in the presence of inflammatory conditions. PD-1 expression might thus serve to limit the activity of NK cells during chronic anti-viral immune response, thereby protecting latently-infected cells from NK-cell mediated elimination, but at the same time allowing the maintenance of a viral reservoir and occurrence of viral reactivation episodes. NK cell exhaustion is reminiscent of hyporeactivity of NK cells observed in MHC-1-deficient patients and mice [110, 111, 114], in which overactivation of NK cells in the absence of host MHC-1 leads to their desensitization for further interactions with other targets. Finally, an important implication of the present study is the possibility that pharmacological agents that block PD1 signaling may be of benefit to improve the functionality of not only exhausted T cells but also NK cells in the treatment of tumors or chronic infections.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

HHV8-infected individuals were described previously [83]. Briefly, there were 34 patients with a history of KS (14 HIV-related and 20 classical KS) and 25 asymptomatic HHV8 carriers (15 HIV+ and 10 HIV- subjects). The HIV patient group consisted of 14 HHV8-negative HIV patients. HIV+ patients in the different groups were all aviremic upon antiretroviral treatment. The HCV patient group (ANRS HC-EP28 study) consisted of 41 chronically infected patients including 32 viremic (naïve of treatment, or who discontinued treatment at least 6 months before study) and 9 aviremic subjects (sustained viral response following treatment). Healthy controls were 36 blood donor volunteers. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and French legislation, and received approval of the Saint-Louis and Pitié-Salpêtrière Hospital Ethical Committees (P040105 and A00822-37, respectively). All participants provided written informed consent.

Flow cytometry

Ex vivo surface and intracellular staining was performed immediately after peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation (Lymphoprep; Abcys). Cells were first incubated for 20 min at 4°C in the dark with FITC-conjugated or APC-conjugated anti-PD-1 antibody (MIH4, IgG1k) or the respective isotype control (BD Biosciences). Cells were then washed and stained with a combinations of the following antibodies: Pacific Blue-conjugated anti-CD3; PE-conjugated anti-CD25, anti-PD-L1, anti-CD57; APC-conjugated anti-CD161; FITC-conjugated anti-DNAM-1, anti-CD107a (all from BD Biosciences); PE-Cy7-conjugated anti-CD56; PE-conjugated anti-CD69, anti-NKp30, anti-NKp46, anti-NKp44, anti-CD158e1e2 (KIR3DL1/S1), anti-CD158i (KIR2DS4); anti-CD158ah (KIR2DL1/S1), anti-CD158bbj (KIR2DL2/L3/S2), anti-CD16 (all from Beckman Coulter); PE-conjugated anti-NKG2D (eBioscience); APC-conjugated anti-CD122 (IL-15R β) (Biolegend); APC-conjugated anti-NKp80, anti-NKG2A, anti-NKG2C (all from R&D Systems). Dead cells were excluded with 7-Amino Actinomycin (7-AAD, Via-Probe, BD Biosciences). PE-Annexin V (BD Biosciences) staining was performed according to the manufacturer's instructions. For intracellular detection of Ki-67, perforin and T-bet, cells were fixed in 1% formaldehyde, permeabilized with 0.2% saponin and stained with PE-conjugated anti-Ki67 (BD Biosciences); PE-conjugated anti-T-bet (eBioscience); or FITC-conjugated anti-perforin (BD Biosciences). Cells were analyzed on FACSCalibur or LSRFortessa (BD Biosciences) flow cytometer, collecting a total of at least 100,000 events in a live gate. Data were analyzed using FlowJo software.

NK cell stimulations and functional assays

Freshly isolated PBMCs from healthy donors were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), and stimulated with different cytokines or growth factors: recombinant human IL-2 (AbCys), IL-15, IL-12, IL-21, IL-1 β (all from PeproTech), IL-18, IL-6, IL-10, IFN γ , TGF β , VEGF (all from R&D Systems), or with TLR ligands Poly(I:C), CpG ODN 2006 and R848 (Invivogen). Prostaglandin E2 (PGE2) was purchased from Cayman Chemical

Cryopreserved PBMCs from patients exhibiting more than 3% of PD-1-positive NK cells were used for functional assays. In brief, PBMCs were thawed in culture medium containing 20 U/ml of IL-2, rested overnight, then incubated (5×10^5 per U-bottom well) in the presence or the absence of K562 target cells (5×10^4 per U-bottom well) or PMA (50 ng/ml) plus ionomycin (1 μ g/ml) for 5 hr. FITC-conjugated anti-CD107a (BD Biosciences) was added directly at the beginning of the experiment. After 1 hr at 37°C in 5% CO₂, brefeldin A (1 μ g/ml) and monensin

(6 µg/ml, Sigma) were added for additional 4 hrs. Cells were then harvested, washed, and stained with APC-conjugated anti-PD-1 antibody, followed by Pacific Blue-conjugated anti-CD3, PE-Cy7-conjugated anti-CD56, and 7-AAD. For intracellular IFN γ analysis, cells were fixed following surface staining, permeabilized with 0.2% saponin and stained with FITC-conjugated anti-IFN- γ antibody (BD Biosciences) for an additional 30 min. Alternatively, PBMCs (2×10^5 per well) were stimulated in the presence of 10 µg/ml plate-bound anti-NKp30 or anti-NKp46 (R&D Systems) mAbs or respective isotype control, and processed as above. Where indicated, cells were preactivated overnight with IL-2 (100 U/ml) or IL-15 (50 ng/ml) before stimulation. For mAb-induced redirected degranulation experiments using FcR $^+$ P815 target cells, PBMCs were incubated for 5 hours with anti-CD16 mAb (10 µg/ml, BD Biosciences) or control isotype, in the presence or absence of PDL1-Fc chimeric molecule (10 µg/ml, R&D Systems) or the corresponding isotype control.

Quantitative RT-PCR

NK cells were purified from PBMCs by negative selection using magnetic microbead separation technique (StemCell Technologies) and stained with FITC-conjugated anti-PD-1, Pacific Blue-conjugated anti-CD3, PE-Cy7-conjugated anti-CD56 and 7-AAD. PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells were then sorted on BD FACS Aria II, and total RNA was extracted using RNeasy Mini kits (Qiagen) and retrotranscribed into cDNA using PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara Bio Inc.). Expression of the following genes was analyzed with quantitative PCR using Light Cycler 480 detection system (Roche) and the following TaqMan real time ready single assays (Roche) according to the manufacturer's instructions: CD56 (assay identity: 111243), NKp46 (assay identity: 117489), PDCD1 (PD-1) (assay identity: 140931), GATA3 (assay identity: 110864), T-bet (assay identity: 114448), KLRG1 (assay identity: 126102), and BLIMP1 (assay identity: 110305). Gene expression was normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1, assay identity: 102079) mRNA levels.

Vector design and construction

Human PD-1 cDNA was PCR amplified from a pEYFP-N1-PD1 construct [191]. The PCR product was cloned into the lentiviral plasmid pDestDH1 containing the puromycin resistance gene using the Gateway technology (Invitrogen). The lentiviral plasmid pcDH1 containing the puromycin resistance gene was used as control vector (both plasmids were kindly provided by Philippe Benaroch and François-Xavier Gobert, Institut Curie, Paris, France). Replication-

defective lentivirus particles pseudotyped with the envelope G protein of vesicular stomatitis virus G were produced in HEK 293T cells cotransfected with a mix of plasmids: psPAX2, pMD2.G (supplied by D. Trono; now Addgene plasmids 12260 and 12259, respectively) and either pDestDH1 PD-1 or pcDH1 plasmid. Supernatants were collected 48 h later and concentrated by ultracentrifugation ($120,000 \times g$ for 90 min).

NKL cells transduction with lentivirus

NKL cells, a human IL-2-dependent NK-cell line, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1% penicillin-streptomycin and 100 U/ml IL-2. For lentiviral infection, NKL cells were stimulated with IL-2 (1000 UI/ml) and IL-21 (20 ng/ml) for 48 hours, washed and resuspended (2×10^6 / 350 μ l) in fresh medium supplemented with IL-2 and IL-21. Cells were plated onto flat-bottomed 12-well (2×10^6 per well) and infected with 100 μ l of concentrated virus supernatant containing protamine sulfate (8 μ g/ml) and BX795 (6 μ M, Invivogen). Following 4hr of incubation at 37°C in 5% CO₂, supernatant was removed and cells were maintained in fresh medium supplemented with IL-2 (100 U/ml) for 24 hours. Cells were then washed and resuspended in fresh medium with IL-2 (100 U/ml) and puromycin (3 μ g/ml). PD-1 expression was evaluated 48 hours later by FACS analysis.

Statistical analysis

All statistical tests were performed with Prism software (GraphPad). Comparisons between two groups were performed using the Wilcoxon and the Mann-Whitney t tests for paired and unpaired groups, respectively. Two-sided p values less than 0.05 were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nadège Bercovici (Institut Cochin, Paris, France) for providing the pEYFP-N1-PD1 construct.

This work was supported by grants from Sidaction (AI21-2/01751) and Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites ANRS (HC-EP28). AB-F was supported by Sidaction. The authors have no conflicting financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: PD-1 expression on NK cells in patients with chronic viral infections.

(A) Gating strategy for identifying PD-1-expressing NK cells. NK subpopulations were gated as follows: singlets, lymphocytes, CD3-CD56⁺ NK cells, and 7AAD⁻ (live cells). Representative PD-1 staining on CD56⁺ NK cells in a patient and a healthy control is shown.

(B) Statistical dot plots showing the percentage of PD-1^{pos} NK cells and corresponding mean values (horizontal bars) in KS patients (KS⁺, n= 34), HHV8 asymptomatic carriers (HHV8⁺, n= 25), HHV8-negative ART-treated HIV patients (HIV⁺, n= 14), chronically infected HCV patients (HCV⁺, n= 41) and healthy controls (HC, n= 36). P values (Mann-Whitney test) are indicated. Because of non-specific staining occurring with the FITC-conjugated anti-PD-1 mAb, a two-step staining strategy was always performed as described in the Methods section (incubation with anti-PD-1 mAb, washing, then incubation with other conjugated mAbs). Values represent PD-1-specific staining = % staining with PD-1 mAb - % staining with isotype control.

(C) Correlation between the frequencies PD-1 expressing cells among NK cells and CD8 T cells in chronically infected patients. Spearman rank correlation (r) and P values are indicated

Figure 2: Phenotype analysis of PD-1^{pos} NK cells

(A-B) FACS analysis of the indicated NK cell markers in a representative patient.

(A) Activation, differentiation and proliferation markers. For most surface molecules, respective histograms for PD-1^{pos} (gray histograms) and PD-1^{neg} cells (empty histograms) are overlaid. Expression of CD107a in CD3-CD56⁺ NK cells is shown as zebra plots.

(B) Activating and inhibitory NK cell receptors. KIR staining represents expression of whole KIRs, monitored by a cocktail of KIR antibodies.

(C) Summary graphs of expression of NK cell markers significantly differing between PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells in the individual sample (n= 6 to 11). Shown are mean of GeoMFI for CD69, CD25, NKp44 and NKp46, and mean percentage of expressing cells for CD107a and Annexin V. P values (Wilcoxon t test) are indicated.

Figure 3: In vitro induction of PD-1 on control NK cells

(A-B) Freshly isolated PBMCs from healthy controls were stimulated in the indicated conditions and surface PD-1 expression was monitored on CD3⁻CD56⁺ NK cells.

Representative histograms of 3 independent experiments are shown. (A) 12h stimulation with PMA plus ionomycin (PMA/Iono). (B) 48h stimulation with IL-2 at 150, 1,000 or 10,000 U/ml. Expression of PD-1 on CD3⁺CD56⁺ T cells (lower panel) is also shown for comparison. MFI values are indicated. (C) Left panel: Cells were stimulated for 72h with 10 µg/ml of plate-bound antibodies to CD16, NKp30, NKp46 (gray histograms) or their matching isotype controls (black thick line) in the presence or absence of IL-2 (150 U/ml) or IL-15 (50 ng/ml). PD-1 isotype control is shown as dotted lines. Right panel: Summary graphs of specific PD-1 expression following stimulation by the indicated plate-bound antibodies. Results represent the mean ± standard deviation of 4 independent experiments. P values are indicated (Mann Whitney test). D: Correlation between the proportions of NK cells expressing the indicated receptors in chronically infected patients. Spearman rank correlation (r) and P values are indicated.

Figure 4: NK cell transcription factors and PD-1 expression.

(A) Summary graph showing relative mRNA levels of T-bet, Blimp-1 and GATA-3 relative to HPRT mRNA, in FACSARIA sorted PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cell subsets from 4 patients. (B) Flow cytometry analysis of intracellular T-bet expression shown as the mean ± standard deviation of GeoMFI in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells in 5 patients. (C) T-bet expression in CD3⁺CD56⁺ NK cells according to PD-1 staining intensity. Mature CD3⁺CD56⁺ from a representative patient are gated according to PD-1 staining intensity, and T bet expression is shown for PD-1⁺⁺ (gray histograms), PD-1⁺ (dotted line) and PD-1^{neg} cells (thick line).

Figure 5: PD-1-positive NK cells are hyporeactive.

(A-C) PBMCs were incubated for 5 hours in medium alone or in the presence of K562 target cells (effector:target 10:1), plate-bound anti-NKp30 or NKp46 mAb (or isotype control, 10 µg/ml each), or PMA plus ionomycin, after which CD107a degranulation and IFNγ production were compared in PD-1^{pos} and PD-1^{neg} NK cells.

(A) Representative zebra plots of surface CD107a (left panel) and intracellular IFNγ (right panel) expression in PD-1^{neg} and PD-1^{pos} NK cells. (B) Summary graphs showing CD107a ratio (mean percentage of CD107a⁺ NK cells in the indicated condition relative to percentage of CD107a⁺ NK cells in the absence of stimulation) (upper panel) and IFNγ production (lower panel) in PD-1^{neg} (empty bars) and PD-1^{pos} (gray bars) NK cells (n= 3 to 7 independent

experiments). Error bars indicate standard deviation. P values (Wilcoxon test) are given. (C) PBMCs were incubated overnight in the presence or absence of IL-2 (20 or 100 U/ml) or IL-15 (50 ng/ml) before stimulation by plate-bound NKp30 or NKp46 mAbs, and CD107a degranulation and IFN γ production were evaluated as described above. Results show the mean \pm standard deviation of 3 to 6 independent experiments. P values (Wilcoxon test) are given. (D) PBMCs were incubated for 5 hours with P815 target cells (effector :target ratio 10 :1) and anti-CD16 mAb or control isotype (5 μ g/ml), in the presence or absence of PDL1-Fc or control chimeric molecule (10 μ g/ml), and CD107a ratio was compared in PD-1^{neg} and PD-1^{pos} NK cells. Graphs show the summary of 6 independent experiments. Error bars indicate standard deviation. P values (Wilcoxon test) are given.

Figure 6: Phenotypic and functional analysis of PD-1 transduced NKL cells.

NKL cell line was stably transduced with PD-1 lentiviral vector (PD-1-vector) or control lentiviral vector (control-vector). (A) PD-1 expression is stable up to 30 days after transduction in NKL cells. (B) Expression of the indicated marker was measured by flow cytometry on PD-1 transduced NKL (gray histograms) and control-vector transduced (open histograms) NKL cells. Dotted lines represent non transduced NKL cells. Histograms are representative of 2 independent experiments performed in each cell line. (C) PD-1-transduced (gray bars) or control-vector transduced (empty bars) NKL cells were incubated for 5 hours in the presence of PMA plus ionomycin or K562 target cells (effector:target 1:1) in 100 U/ml IL-2 containing medium (left panel) or 48 hours after IL-2 withdrawal (right panel), after which CD107a surface expression was determined. Graphs represent the summary of at least 4 independent experiments. Error bars indicate standard deviation. P values (Mann Whitney) are given.

Figure 1

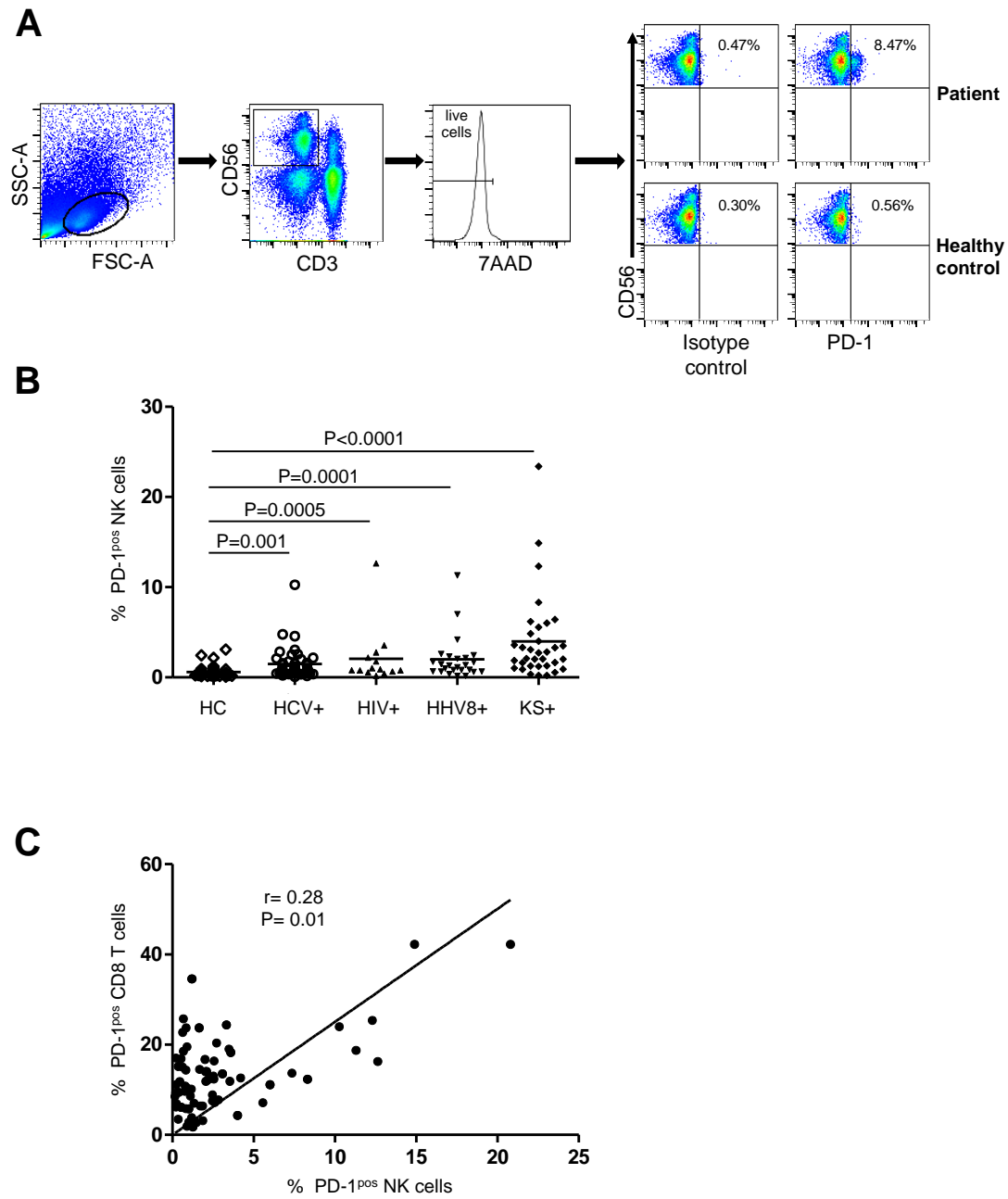


Figure 2

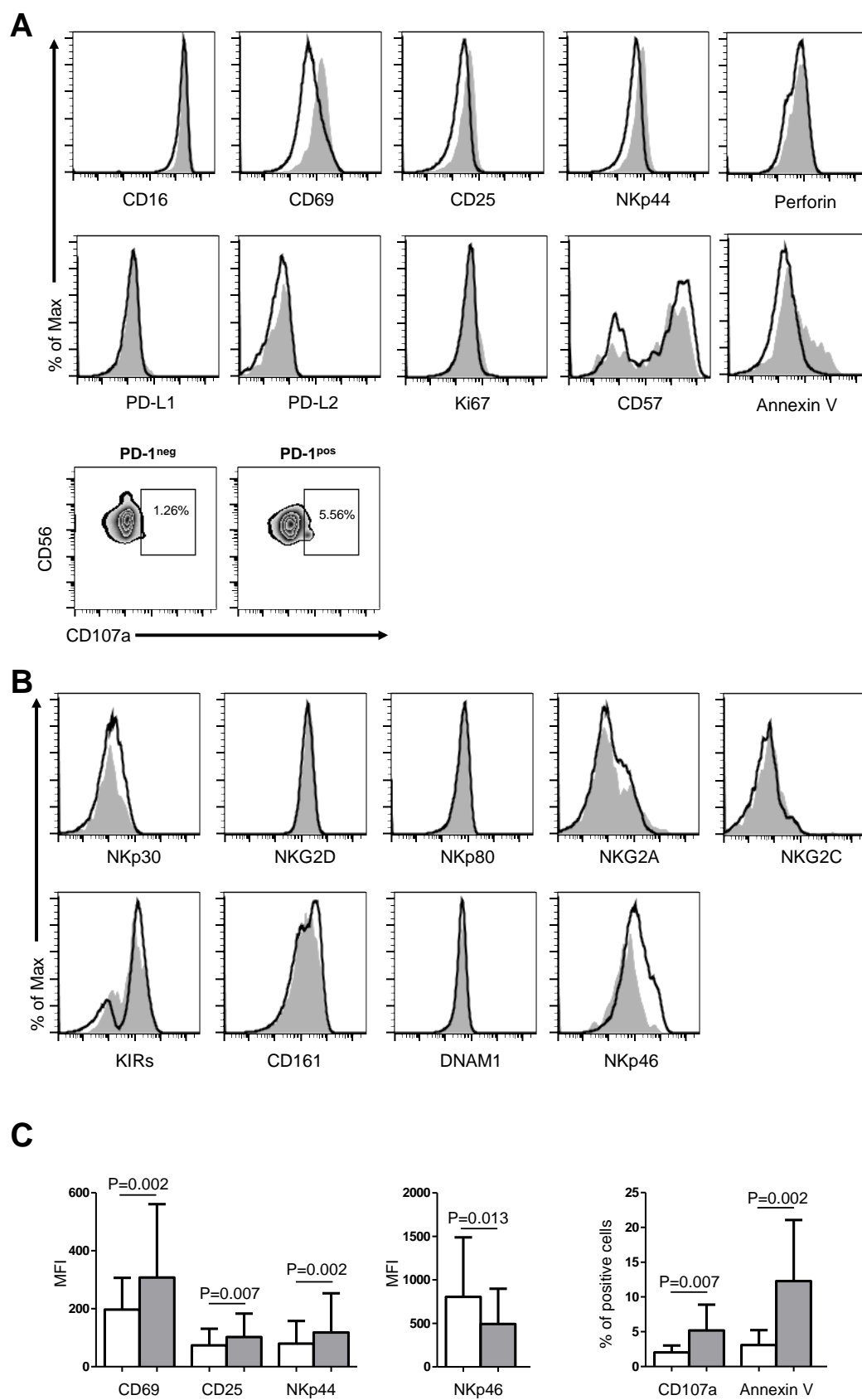


Figure 3

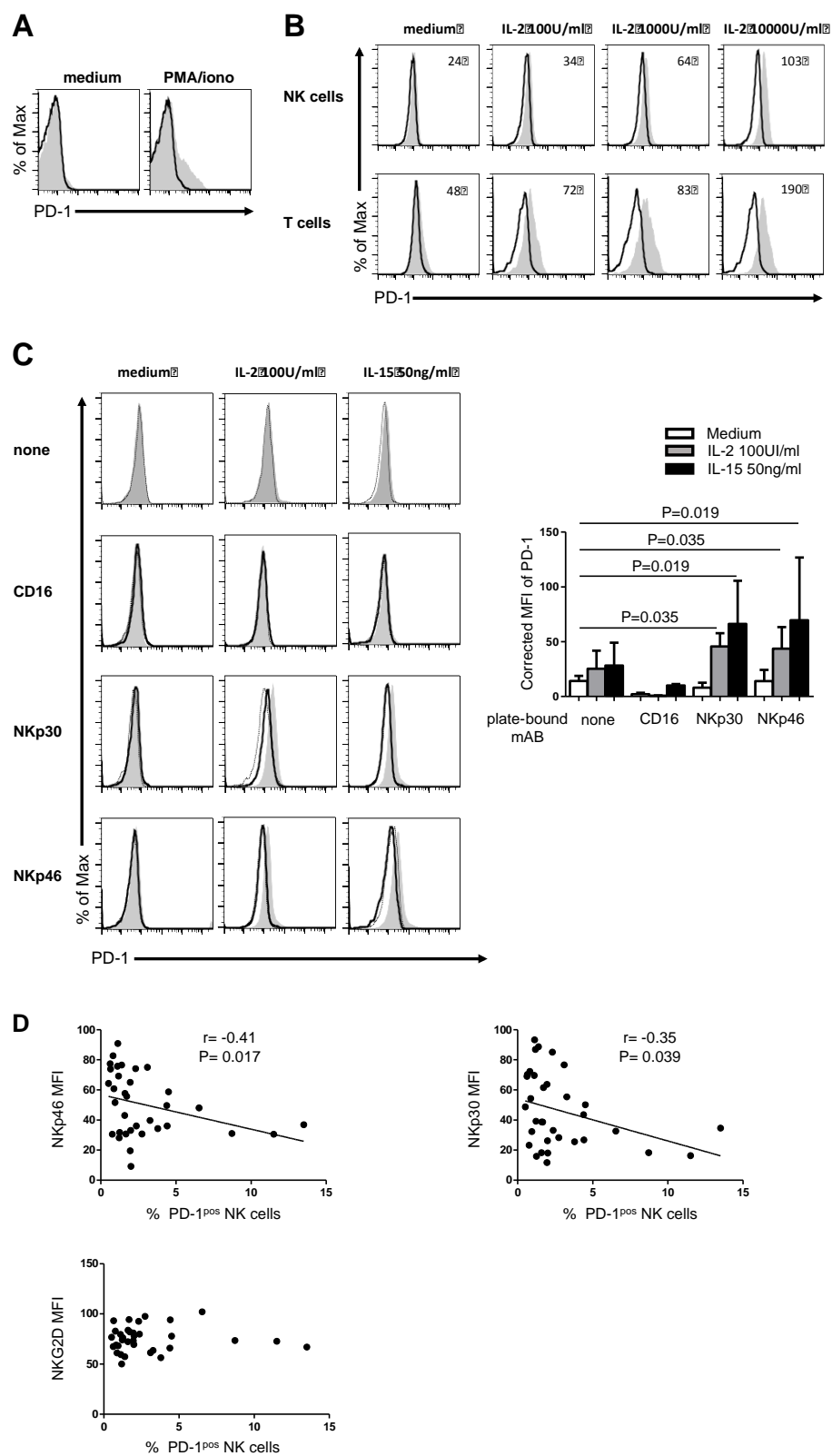


Figure 4

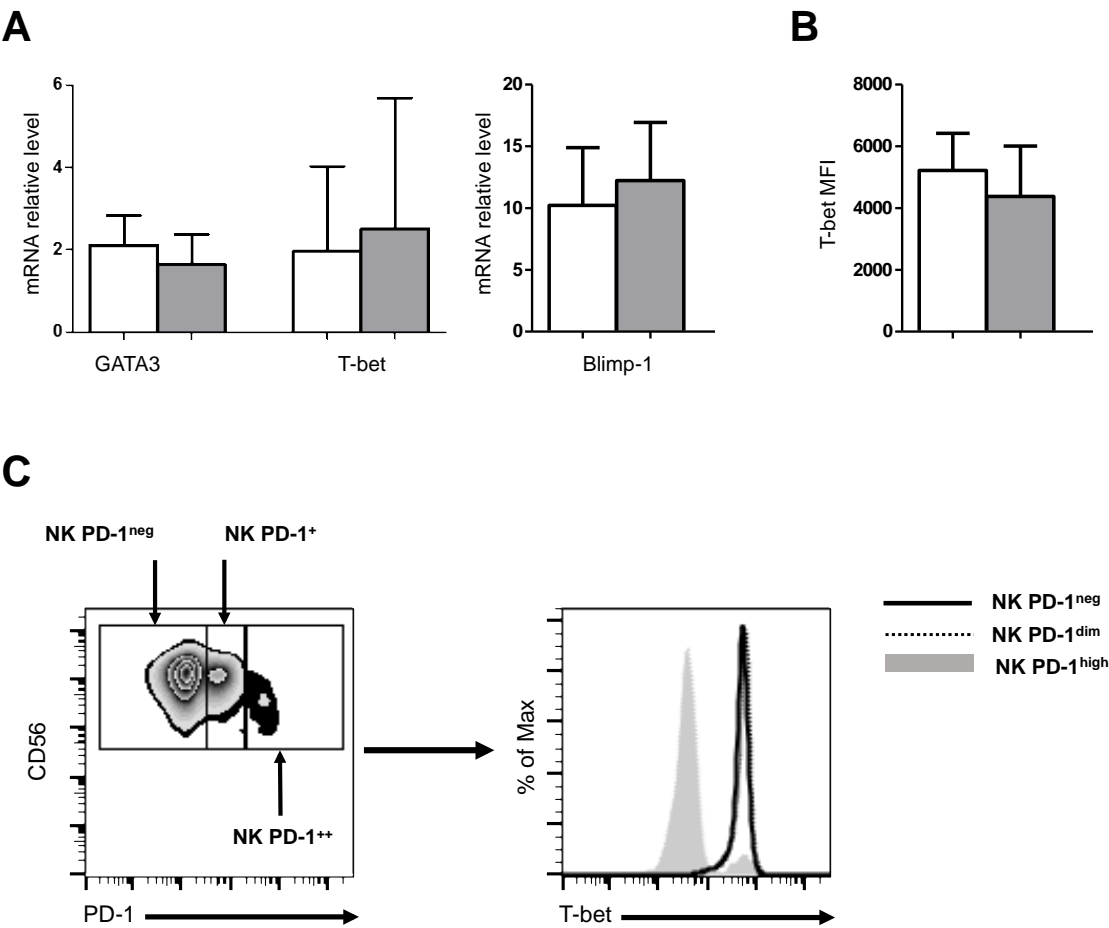


Figure 5

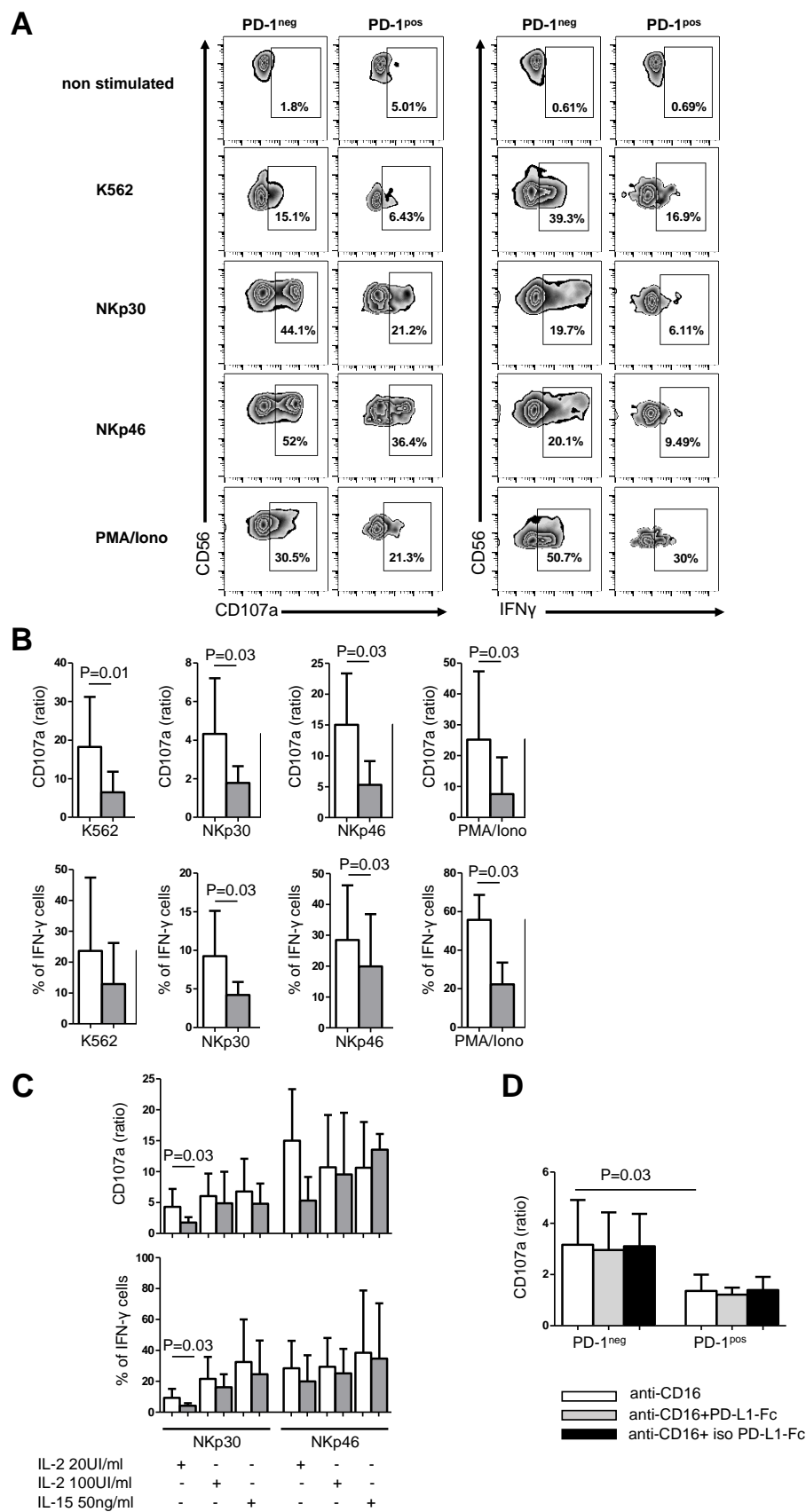
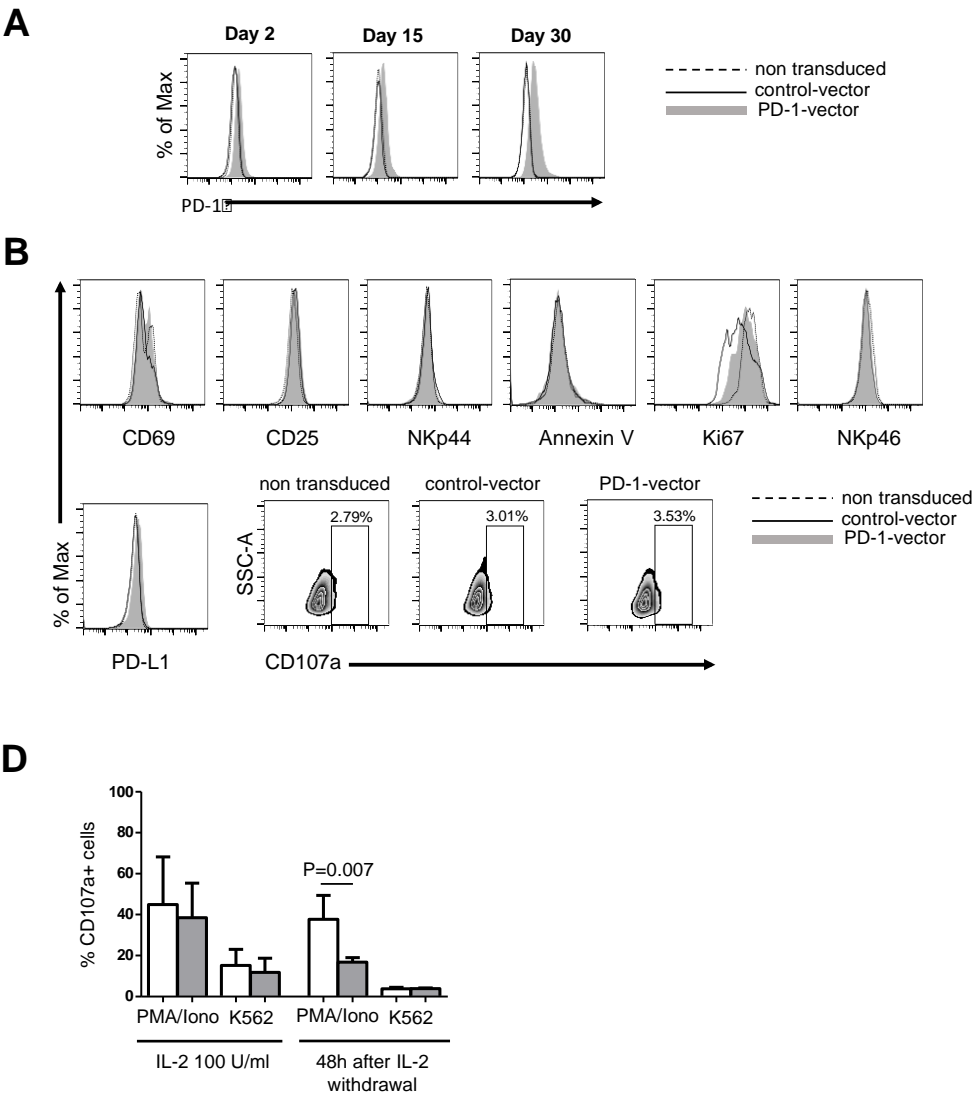


Figure 6



REFERENCES

- Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772.
- Alvarez, I.B., V. Pasquinelli, J.O. Jurado, E. Abbate, R.M. Musella, S.S. de la Barrera, and V.E. Garcia. 2010. Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 202:524-532.
- Anfossi, N., P. Andre, S. Guia, C.S. Falk, S. Roetynck, C.A. Stewart, V. Bresó, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagne, S. Ugolini, and E. Vivier. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25:331-342.
- Barber, D.L., E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
- Bennett, F., D. Luxenberg, V. Ling, I.M. Wang, K. Marquette, D. Lowe, N. Khan, G. Veldman, K.A. Jacobs, V.E. Valge-Archer, M. Collins, and B.M. Carreno. 2003. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 170:711-718.
- Benson, D.M., Jr., C.E. Bakan, A. Mishra, C.C. Hofmeister, Y. Efebera, B. Becknell, R.A. Baiocchi, J. Zhang, J. Yu, M.K. Smith, C.N. Greenfield, P. Porcu, S.M. Devine, R. Rotem-Yehudar, G. Lozanski, J.C. Byrd, and M.A. Caligiuri. 2010. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116:2286-2294.
- Brahmer, J.R., S.S. Tykodi, L.Q. Chow, W.J. Hwu, S.L. Topalian, P. Hwu, C.G. Drake, L.H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H.C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T.M. Salay, S. Alaparthi, J.F. Grosso, A.J. Korman, S.M. Parker, S. Agrawal, S.M. Goldberg, D.M. Pardoll, A. Gupta, and J.M. Wigginton. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-2465.
- Brandt, C.S., M. Baratin, E.C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C.D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier, and S.D. Levin. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *J Exp Med* 206:1495-1503.
- Chang, W.S., J.Y. Kim, Y.J. Kim, Y.S. Kim, J.M. Lee, M. Azuma, H. Yagita, and C.Y. Kang. 2008. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol* 181:6707-6710.
- Chemnitz, J.M., R.V. Parry, K.E. Nichols, C.H. June, and J.L. Riley. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173:945-954.
- Chen, Y., S. Wu, G. Guo, L. Fei, S. Guo, C. Yang, X. Fu, and Y. Wu. 2011. Programmed death (PD)-1-deficient mice are extremely sensitive to murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection. *PLoS Pathog* 7:e1001347.
- Chisholm, S.E., and H.T. Reyburn. 2006. Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *J Virol* 80:2225-2233.
- Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman, and B.D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
- Dupuy, S., M. Lambert, D. Zucman, S.P. Choukem, S. Tognarelli, C. Pages, C. Lebbe, and S. Caillat-Zucman. 2012. Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma. *PLoS Pathog* 8:e1002486.

- Enk, J., and O. Mandelboim. 2014. The role of natural cytotoxicity receptors in various pathologies: emphasis on type I diabetes. *Frontiers in immunology* 5:4.
- Fernandez, N.C., E. Treiner, R.E. Vance, A.M. Jamieson, S. Lemieux, and D.H. Raulet. 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105:4416-4423.
- Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
- Freud, A.G., A. Yokohama, B. Becknell, M.T. Lee, H.C. Mao, A.K. Ferketich, and M.A. Caligiuri. 2006. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203:1033-1043.
- Fuller, M.J., B. Callendret, B. Zhu, G.J. Freeman, D.L. Hasselschwert, W. Satterfield, A.H. Sharpe, L.B. Dustin, C.M. Rice, A. Grakoui, R. Ahmed, and C.M. Walker. 2013. Immunotherapy of chronic hepatitis C virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (PD-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15001-15006.
- Garg, A., P.F. Barnes, A. Porgador, S. Roy, S. Wu, J.S. Nanda, D.E. Griffith, W.M. Girard, N. Rawal, S. Shetty, and R. Vankayalapati. 2006. Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. *J Immunol* 177:6192-6198.
- Gill, S., A.E. Vasey, A. De Souza, J. Baker, A.T. Smith, H.E. Kohrt, M. Florek, K.D. Gibbs, Jr., K. Tate, D.S. Ritchie, and R.S. Negrin. 2012. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* 119:5758-5768.
- Golden-Mason, L., J. Klarquist, A.S. Wahed, and H.R. Rosen. 2008. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol* 180:3637-3641.
- Golden-Mason, L., B. Palmer, J. Klarquist, J.A. Mengshol, N. Castelblanco, and H.R. Rosen. 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81:9249-9258.
- Guma, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gomez-Lozano, N. Malats, and M. Lopez-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104:3664-3671.
- Hue, S., R.C. Monteiro, S. Berrih-Aknin, and S. Caillat-Zucman. 2003. Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *J Immunol* 171:1909-1917.
- Kao, C., K.J. Oestreich, M.A. Paley, A. Crawford, J.M. Angelosanto, M.A. Ali, A.M. Intlekofer, J.M. Boss, S.L. Reiner, A.S. Weinmann, and E.J. Wherry. 2011. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* 12:663-671.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
- Kim, M., N.R. Osborne, W. Zeng, H. Donaghy, K. McKinnon, D.C. Jackson, and A.L. Cunningham. 2012. Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 188:4158-4170.
- Kim, S., J. Poursine-Laurent, S.M. Truscott, L. Lybarger, Y.J. Song, L. Yang, A.R. French, J.B. Sunwoo, S. Lemieux, T.H. Hansen, and W.M. Yokoyama. 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436:709-713.
- Latchman, Y., C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.

- Li, S.S., S.K. Kyei, M. Timm-McCann, H. Ogbomo, G.J. Jones, M. Shi, R.F. Xiang, P. Oykhman, S.M. Huston, A. Islam, M.J. Gill, S.M. Robbins, and C.H. Mody. 2013. The NK receptor Nkp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell host & microbe* 14:387-397.
- Lisnic, V.J., A. Krmpotic, and S. Jonjic. 2010. Modulation of natural killer cell activity by viruses. *Current opinion in microbiology* 13:530-539.
- Lodoen, M.B., and L.L. Lanier. 2006. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 18:391-398.
- Lopez-Verges, S., J.M. Milush, S. Pandey, V.A. York, J. Arakawa-Hoyt, H. Pircher, P.J. Norris, D.F. Nixon, and L.L. Lanier. 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116:3865-3874.
- Lopez-Verges, S., J.M. Milush, B.S. Schwartz, M.J. Pando, J. Jarjoura, V.A. York, J.P. Houchins, S. Miller, S.M. Kang, P.J. Norris, D.F. Nixon, and L.L. Lanier. 2011. Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14725-14732.
- Ma, C.J., L. Ni, Y. Zhang, C.L. Zhang, X.Y. Wu, A.N. Atia, P. Thayer, J.P. Moorman, and Z.Q. Yao. 2011. PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis C virus infection. *Immunology* 132:421-431.
- Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T.I. Arnon, Y. Bushkin, D.M. Davis, J.L. Strominger, J.W. Yewdell, and A. Porgador. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.
- Nakamoto, N., D.E. Kaplan, J. Coleclough, Y. Li, M.E. Valiga, M. Kaminski, A. Shaked, K. Olthoff, E. Gostick, D.A. Price, G.J. Freeman, E.J. Wherry, and K.M. Chang. 2008. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134:1927-1937, 1937 e1921-1922.
- Narni-Mancinelli, E., S. Ugolini, and E. Vivier. 2013. Tuning the threshold of natural killer cell responses. *Curr Opin Immunol* 25:53-58.
- Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13866-13871.
- Orr, M.T., and L.L. Lanier. 2010. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 142:847-856.
- Parry, R.V., J.M. Chemnitz, K.A. Frauwirth, A.R. Lanfranco, I. Braunstein, S.V. Kobayashi, P.S. Linsley, C.B. Thompson, and J.L. Riley. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25:9543-9553.
- Petrovas, C., J.P. Casazza, J.M. Brenchley, D.A. Price, E. Gostick, W.C. Adams, M.L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D.C. Douek, and R.A. Koup. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203:2281-2292.
- Quigley, M., F. Pereyra, B. Nilsson, F. Porichis, C. Fonseca, Q. Eichbaum, B. Julg, J.L. Jesneck, K. Brosnahan, S. Imam, K. Russell, I. Toth, A. Piechocka-Trocha, D. Dolfi, J. Angelosanto, A. Crawford, H. Shin, D.S. Kwon, J. Zupkosky, L. Francisco, G.J. Freeman, E.J. Wherry, D.E. Kaufmann, B.D. Walker, B. Ebert, and W.N. Haining. 2010. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 16:1147-1151.
- Robbins, S.H., K.B. Nguyen, N. Takahashi, T. Mikayama, C.A. Biron, and L. Brossay. 2002. Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *J Immunol* 168:2585-2589.
- Said, E.A., F.P. Dupuy, L. Trautmann, Y. Zhang, Y. Shi, M. El-Far, B.J. Hill, A. Noto, P. Ancuta, Y. Peretz, S.G. Fonseca, J. Van Grevenynghe, M.R. Boulassel, J. Bruneau, N.H. Shoukry, J.P. Routy, D.C. Douek, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2010. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* 16:452-459.

- Seidel, E., A. Glasner, and O. Mandelboim. 2012. Virus-mediated inhibition of natural cytotoxicity receptor recognition. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*
- Sheppard, K.A., L.J. Fitz, J.M. Lee, C. Benander, J.A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J.M. Jussif, L.L. Carter, C.R. Wood, and D. Chaudhary. 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 574:37-41.
- Sivori, S., S. Carlomagno, S. Pesce, A. Moretta, M. Vitale, and E. Marcenaro. 2014. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Frontiers in immunology* 5:105.
- Terme, M., E. Ullrich, L. Aymeric, K. Meinhardt, J.D. Coudert, M. Desbois, F. Ghiringhelli, S. Viaud, B. Ryffel, H. Yagita, L. Chen, S. Mecheri, G. Kaplanski, A. Prevost-Blondel, M. Kato, J.L. Schultze, E. Tartour, G. Kroemer, M. Degli-Esposti, N. Chaput, and L. Zitvogel. 2012. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res* 72:2757-2767.
- Terme, M., E. Ullrich, L. Aymeric, K. Meinhardt, M. Desbois, N. Delahaye, S. Viaud, B. Ryffel, H. Yagita, G. Kaplanski, A. Prevost-Blondel, M. Kato, J.L. Schultze, E. Tartour, G. Kroemer, N. Chaput, and L. Zitvogel. 2011. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res* 71:5393-5399.
- Thibult, M.L., E. Mamessier, J. Gertner-Dardenne, S. Pastor, S. Just-Landi, L. Xerri, B. Chetaille, and D. Olive. 2013. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 25:129-137.
- Topalian, S.L., F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott, J.D. Powderly, R.D. Carvajal, J.A. Sosman, M.B. Atkins, P.D. Leming, D.R. Spigel, S.J. Antonia, L. Horn, C.G. Drake, D.M. Pardoll, L. Chen, W.H. Sharfman, R.A. Anders, J.M. Taube, T.L. McMiller, H. Xu, A.J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G.D. Kolli, A. Gupta, J.M. Wigginton, and M. Sznol. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366:2443-2454.
- Townsend, M.J., A.S. Weinmann, J.L. Matsuda, R. Salomon, P.J. Farnham, C.A. Biron, L. Gapin, and L.H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20:477-494.
- Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E.A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R.S. Balderas, J.P. Routy, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12:1198-1202.
- Vivier, E., D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, and S. Ugolini. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-49.
- Wang, J.M., Y.Q. Cheng, L. Shi, R.S. Ying, X.Y. Wu, G.Y. Li, J.P. Moorman, and Z.Q. Yao. 2013. KLRG1 negatively regulates natural killer cell functions through the Akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 87:11626-11636.
- Wang, S.F., S. Fouquet, M. Chapon, H. Salmon, F. Regnier, K. Labroquere, C. Badoual, D. Damotte, P. Validire, E. Maubec, N.B. Delongchamps, A. Cazes, L. Gibault, M. Garcette, M.C. Dieu-Nosjean, M. Zerbib, M.F. Avril, A. Prevost-Blondel, C. Randriamampita, A. Trautmann, and N. Bercovici. 2011. Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. *PLoS One* 6:e17621.
- Wherry, E.J., S.J. Ha, S.M. Kaech, W.N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J.N. Blattman, D.L. Barber, and R. Ahmed. 2007. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27:670-684.
- Wiesmayr, S., S.A. Webber, C. Macedo, I. Popescu, L. Smith, J. Luce, and D. Metes. 2012. Decreased Nkp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLT. *Eur J Immunol* 42:541-550.
- Yokosuka, T., M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, and T. Saito. 2012. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 209:1201-1217.

- Youngblood, B., K.J. Oestreich, S.J. Ha, J. Duraiswamy, R.S. Akondy, E.E. West, Z. Wei, P. Lu, J.W. Austin, J.L. Riley, J.M. Boss, and R. Ahmed. 2011. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* 35:400-412.
- Zhang, J.Y., Z. Zhang, X. Wang, J.L. Fu, J. Yao, Y. Jiao, L. Chen, H. Zhang, J. Wei, L. Jin, M. Shi, G.F. Gao, H. Wu, and F.S. Wang. 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109:4671-4678.

**ETUDE II : PROSTAGLANDINE E2 (PGE2) :
UN REGULATEUR NEGATIF AUTOCRINE
ET PARACRINE DE L'ACTIVATION IL-15
DEPENDANTE DES CELLULES NK ?**

Etude II : Prostaglandine E2 (PGE2) : un régulateur négatif autocrine et paracrine de l'activation IL-15 dépendante des cellules NK ?

Préambule

La PGE2 provient du métabolisme de l'acide arachidonique sous l'action des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2. L'acide arachidonique est lui-même dérivé du catabolisme des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 cytoplasmique (cPLA2) (figure 18) [319]. L'expression de COX-1 est constitutive, et est responsable d'une production basale de PGE2 en situation physiologique. L'expression de COX-2 est induite dans différentes conditions pathologiques, en particulier en situation inflammatoire, sous l'effet de cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IL-15.

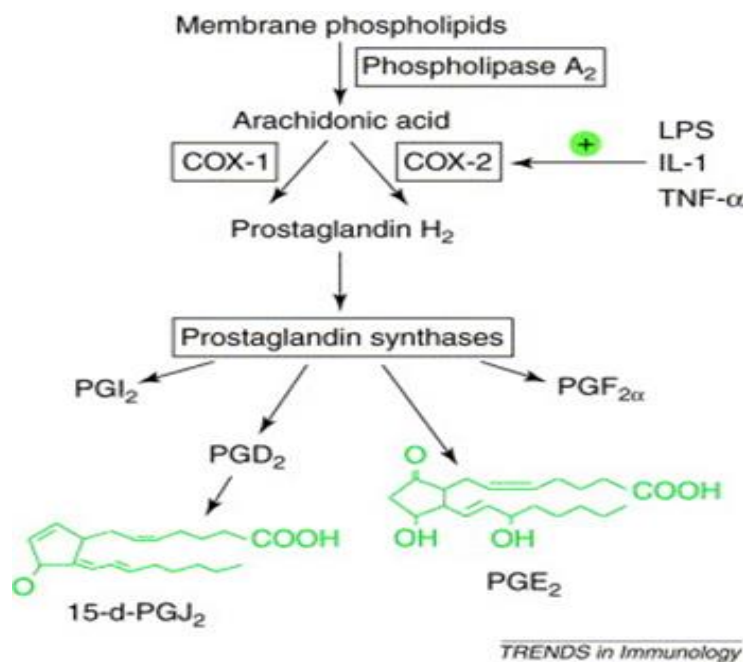


Figure 18. Voie de production des prostaglandines L'acide arachidonique est libéré à partir des membranes cellulaires par l'action de la phospholipase A2 cytoplasmique (PLA2c). Les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) produisent la prostaglandine H2 (PGH2) à partir de l'acide arachidonique, qui est elle-même métabolisée par les prostaglandines synthases en PGI2, PGD2, PGE2 et PGF2 α . [319].

La PGE2 est également produite en quantité abondante par différentes cellules tumorales, et le niveau d'expression de COX-2/PGE2 est associé à une évolution plus agressive et une survie à long terme diminuée dans différents cancers [147]. À côté de ses effets connus sur la prolifération, la survie et la migration des cellules tumorales, et de ses fonctions pro-inflammatoire et pro-angiogénique [138], la PGE2 modifie également la réponse immunitaire anti-tumorale à différents niveaux: induction de cellules dendritiques tolérogènes et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC), induction de réponses Th2 et Th17 aux dépens de réponses Th1, induction de cellules T régulatrices...[320, 321]. La PGE2 joue ainsi un rôle clé dans la mise en place d'un microenvironnement tumoral inflammatoire et immunosuppresseur. Dans le contexte du sarcome de Kaposi (KS), la PGE2, produite en quantité abondante par les cellules tumorales, a un rôle majeur portant à la fois sur le maintien de la latence virale dans les cellules endothéliales infectées, la production de facteurs pro-angiogéniques et inflammatoires, et le contrôle de la croissance et de l'adhésion des cellules tumorales [322]. L'inhibition de COX-2 par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ou par des inhibiteurs pharmacologiques sélectifs (celecoxib par exemple), représente ainsi une approche préventive ou thérapeutique anti-cancéreuse attractive, mais est actuellement limitée par les effets secondaires délétères de ces produits en particulier leur toxicité gastro-intestinale et leurs complications cardiovasculaires.

La PGE2 agit de manière autocrine ou paracrine en se fixant sur des récepteurs E-prostanoides membranaires dont il existe 4 sous-types (EP1-EP4) couplés à différentes protéines G et à des voies de signalisation intracellulaire distinctes (figure 19). Schématiquement, l'engagement d'EP1 conduit à une élévation du taux de Ca^{2+} intracellulaire, alors qu'EP2 et EP4 conduisent à une activation de la voie AMPc/PKA, et donc à la régulation de la transcription de différents gènes impliqués notamment dans l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaire. EP3 est couplé à une protéine G inhibitrice et empêche l'activation par la voie AMPc/PKA [319]. EP4 active également la voie ERK dépendante de la PI3kinase [323]. La PGE2 se lie avec une affinité différente à ses quatre récepteurs : celle-ci est forte pour les récepteurs EP3 et EP4 ($K_d < 1$ nM) alors qu'elle est faible pour les récepteurs EP1 et EP2 ($K_d > 10$ nM) [324].

Les effets de la PGE2 sur la réponse NK ont été peu étudiés à ce jour. In vitro, la PGE2 inhibe la capacité cytotoxique NK [325], et il semble que cet effet passe par la fixation sur les récepteurs EP2 et EP4 [326]. De plus, la PGE2 inhibe la production d'IFN- γ en réponse à la combinaison IL-12/IL-18 [327], et inhibe de manière plus générale le dialogue entre cellules

dendritiques (DC) et cellules NK [328]. Enfin, la PGE2 empêche l'activation des NK par l'IL-15, en bloquant l'expression de la chaîne commune γ du récepteur de l'IL-15 (IL-15R γ) [329].

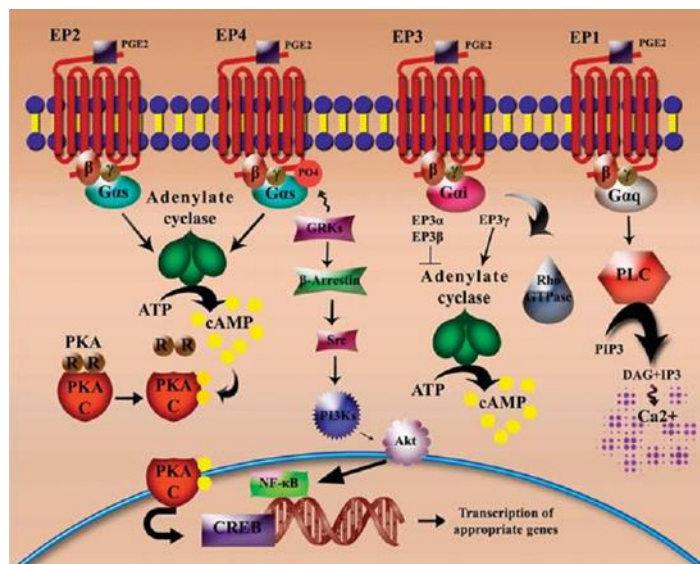


Figure 18. Voies de signalisation en aval des récepteurs E-Prostanoïdes (EP) à la PGE2.

Les quatre récepteurs EP sont couplés à des protéines G de haute affinité et caractérisés par l'activation de voies de signalisation différentes. EP2 et EP4 sont liés à des protéines G α s et induisent l'adénylate cyclase (AC) et l'augmentation de son second messager, l'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc active la PKA, entraînant la dissociation de ses sous-unités régulatrices (R) et catalytiques (C). Les sous-unités catalytiques initient la transactivation du facteur de transcription CREB. EP4 active aussi la voie de signalisation de la PI3K grâce à sa phosphorylation par les kinases couplées aux protéines G. Ceci conduit à l'activation de la transcription de gènes médiée par NF- κ B. Les isoformes d'EP3 diffèrent dans leur capacité à moduler la transduction du signal. EP3 α et EP3 β sont capables de bloquer l'induction de l'AC alors qu'EP3 γ potentialise l'AC et la production d'AMPc. Enfin, EP1 est couplé à une protéine G α q et la transmission du signal passe par la voie PLC/IP3, conduisant à la formation des seconds messagers DAG et IP3, avec une libération rapide d'ions calcium à partir des compartiments intracellulaires [330].

Notre groupe s'intéresse depuis plusieurs années aux mécanismes d'échappement à la réponse immune des virus oncogènes, en particulier le virus HHV8 (Human Herpes Virus 8, ou Kaposi Sarcoma associated Herpes Virus KSHV), et a récemment montré que l'une des stratégies d'échappement à la réponse NK porte sur la modulation des voie d'activation NKG2D et IL-15 par la prostaglandine E2 (PGE2) d'origine tumorale [83]. Ces résultats récents apportent de nouveaux éléments en faveur d'un rôle crucial de la PGE2 sur la fonction NK

[331]. Ils montrent que la PGE2 diminue spécifiquement l'expression membranaire du récepteur NKG2D à la surface des cellules NK au cours du KS, responsable d'une baisse parallèle de leur fonction cytotoxique. Des résultats concordants ont été publiés par le groupe de Daniel Olive dans le contexte du cancer du sein [332]. De plus, la PGE2 inhibe l'induction par l'IL-15 de l'expression de NKG2D et de la prolifération et la survie des NK. Ces dernières observations nous intéressent tout particulièrement, puisque l'IL-15 est non seulement un inducteur puissant de l'expression de NKG2D, mais exerce également un effet synergique sur la voie d'activation NKG2D via la phosphorylation de sa protéine adaptatrice DAP10 induite par JAK3 [333]. De plus, il existe un lien étroit entre l'activation des kinases ERK et JNK (en aval de NKG2D), et l'activité enzymatique de la cPLA2 [334, 335]. Notre hypothèse est que la PGE2 constitue un mécanisme de rétrocontrôle négatif de l'activation NK, dont les conséquences sont distinctes selon le contexte pathologique : situation inflammatoire aiguë ou bien au cours d'un processus tumoral (situation inflammatoire chronique).

L'étude de la régulation de la réponse NK par la PGE2 a fait l'objet d'une deuxième étude faite en collaboration avec Marie Duchamp.

Prostaglandine E2 (PGE2) : un régulateur négatif autocrine et paracrine de l'activation IL-15 dépendante des cellules NK ?

Marie Duchamp, Asma Beldi-Ferchiou, Marion Lambert, Stéphanie Dupuy, Sophie Caillat-Zucman.

Introduction

La Prostaglandine E2 (PGE2) est un médiateur lipidique de l'inflammation doté de fonction immuno-modulatrices [319, 336, 337]. Elle dérive du métabolisme de l'acide arachidonique sous l'action des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2 [337]. La PGE2 est produite par différents types de cellules immunitaires et non-immunitaires, y compris les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules Treg Foxp3+CD4+CD25+ ainsi que de nombreuses cellules tumorales [83, 144-147]. La PGE2 exerce ses fonctions biologiques à travers quatre sous types de récepteurs E-prostanoides membranaires (EP1-EP4) couplés à différentes protéines G et à des voies de signalisation intracellulaire distinctes. Ces récepteurs ont une large distribution (cellules immunitaires et non immunitaires) ce qui reflète la pléiotropie de la PGE2 [338].

La PGE2 semble jouer un rôle néfaste au cours de plusieurs processus tumoraux tels que le cancer du poumon, le cancer du sein, et les cancers ORL. Elle est de plus souvent associée à un mauvais pronostic [147]. En effet, la PGE2 est non seulement capable de promouvoir la croissance et la survie des cellules tumorales, mais elle est également impliquée dans l'échappement tumoral à la réponse immune de l'hôte [322] [320, 321]. Certaines études montrent l'effet bénéfique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dans la prévention de certaines tumeurs, et ce en inhibant les enzymes COX et en réduisant par conséquent la production des prostaglandines telle que la PGE2 [339]. Ces approches restent limitées par les effets secondaires délétères des AINS.

Dans un travail récent, notre équipe a montré qu'au cours du sarcome de Kaposi (KS), la PGE2 favorise l'échappement tumoral à la réponse NK de l'hôte [83]. En effet, la PGE2 induit une diminution de l'expression membranaire du récepteur NKG2D à la surface des cellules NK. Cette diminution se traduit sur le plan fonctionnel par une baisse parallèle des capacités cytotoxiques des cellules NK. De plus, la PGE2 s'oppose aux effets de l'IL-15 sur les cellules NK en inhibant l'induction de l'expression de NKG2D ainsi que leur prolifération et leur survie.

Les effets autocrines et paracrines de la PGE2 sur la réponse NK, ainsi que les récepteurs EP impliqués, ont été peu étudiés à ce jour. Chez l'homme, la PGE2 exerce un effet inhibiteur sur leurs fonctions cytotoxiques et affecte le dialogue croisé entre cellules dendritiques (DC) et cellules NK [325, 326, 328]. La PGE2 est également capable d'empêcher l'activation des NK par l'IL-15, en bloquant l'expression de la chaîne commune γ du récepteur de l'IL-15 (IL-15R γ) [329]. Le blocage par un antagoniste du récepteur EP4 de la PGE2 prévient l'effet immunosuppresseur qu'elle exerce sur les cellules NK [340]. L'inhibition de la PGE2 sécrétée par les cellules tumorale restaure les fonctions des cellules NK [341].

Notre hypothèse est que la PGE2 constitue un mécanisme de rétrocontrôle négatif de l'activation des cellules NK induite par l'IL-15. Au cours de ce travail, nous avons pu caractériser les récepteurs à la PGE2 impliqués dans la diminution de l'expression de NKG2D et de l'IL-15R γ sur les cellules NK humaines. Ainsi, nous mettons en évidence l'implication des récepteurs EP2 et EP4 dans l'inhibition des effets activateurs des cellules NK médiés par l'IL-15. L'expression de ces récepteurs est elle-même régulée de manière opposée par l'IL-15 et la PGE2 au niveau des cellules NK. De plus, nous montrons que les cellules NK sont capables de produire de la PGE2, ce qui est en faveur de la présence d'un effet autocrine de cette dernière sur les cellules NK.

Matériels et méthodes

Isolement des cellules NK et culture cellulaire

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de sujets sains (donneurs volontaires de sang, n = 20) ont été isolées par gradient de densité et les cellules NK ont été par la suite purifiées par sélection négative grâce au Negative Selection Human NK Cell Enrichment Kit (StemCell Technologies™). La pureté des cellules triées était de l'ordre de 95%. Les cellules triées ont par la suite été mises en culture dans du milieu AIM V® (serum free medium, Life technologies™) à 2×10^6 /ml pour être en présence ou en absence des facteurs suivants utilisés seul ou en différentes combinaison : PGE2 (35 ou 100 ng/ml, Cayman Chemical), IL-15 recombinante (50 ou 100ng/ml, PeproTech), Butaprost (agoniste EP2) (100 μ M, Cayman Chemical) et CAY-10598 (agoniste EP4) (100nM, Cayman Chemical).

Cytométrie en Flux

Après saturation des récepteurs Fc (RFc γ) avec des Ig humaines à 1 %, les marqueurs suivants ont été utilisés en différentes combinaisons pour marquer les cellules NK triées fraîchement isolées ou bien après stimulation : anti-CD3 pacific blue (PB) (BD Biosciences), anti-CD56 phycoérythrine cyanine 7 (PEC y7) (Beckman Coulter), anti-NKG2D phycoérythrine (PE) (eBioscience), anti-CD132 allophycocyanine (APC) (IL-15R γ) (R&D Systems), anti-EP2 PE (IgG polyclonales de lapin, Cayman Chemical), anti-EP4 PE (IgG polyclonales de lapin, Abcam), isotype contrôle IgG PE (IgG polyclonales de lapin, Abcam), anti-EP1 et anti-EP3 non couplés (IgG polyclonales de lapin, Cayman Chemical), anti-IgG de lapin FITC (anti-corps secondaire, IgG polyclonales chèvre, Cayman Chemical). Le marqueur de viabilité Via-Probe (BD Biosciences) a été systématiquement utilisé. L'acquisition des données a été réalisée par cytométrie en flux sur un LSRFortessa™ (BD Biosciences). Pour chaque échantillon, 100 000 évènements au moins sont acquis. Les données sont ensuite analysées grâce au logiciel FlowJo.

Quantification des ARNm

Les cellules NK triées ont été incubées pendant 4 heures, à 37°C et 5 % de CO₂, dans du milieu AIM V en présence ou en absence des facteurs suivants en différentes combinaisons: IL-15 (50 ou 100 ng/ml), PGE₂ (100 ou 35 ng/ml), Butaprost (agoniste EP2) (100 μ M, Cayman Chemical) et CAY-10598 (Agoniste EP4) (100nM, Cayman Chemical). Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS avant d'être congelées à - 80°C dans 350 μ l de RLT-Buffer (Qiagen) additionné d'1 % de β -mercapto-éthanol jusqu'à utilisation. L'ARN total a été extrait avec le RNeasy® Micro Kit (Qiagen), et rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) avec le PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara Bio Inc.). La quantification en temps réel du niveau d'expression des transcrits de COX-1, COX-2, EP1, EP2, EP3 et EP4 a été réalisée grâce aux sondes prédéveloppées TaqMan® (Life Technologies™) en utilisant le kit LightCycler 480 Probes Master (Roche) et Le LightCycler 480 detection system (Roche). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression de l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase-1 (HPRT 1). Un contrôle positif de l'expression de COX-1 et COX-2 a été réalisé à partir des monocytes

isolés par adhérence, stimulés avec du LPS (1 µg/ml) pendant 4 heures dans de l'AIM V et traités comme précédemment décrit.

Quantification de la production de la PGE2 par les cellules NK

La PGE2 a été quantifiée dans les surnageants prélevés après 24 heures de culture grâce au test ELISA (Cayman Chemicals) selon les instructions indiquées.

Tests statistiques

Les comparaisons entre les différentes populations étudiées ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur de $p \leq 0,05$ a été considérée comme étant statistiquement significative.

Résultats

Expression des récepteurs à la PGE2 sur les cellules NK au repos

La PGE2 possède 4 récepteurs distincts connus (EP1, EP2, EP3 et EP4) qui sont couplés à des voies de signalisation intracellulaires différentes. Ces différents récepteurs permettent à la PGE2 de diversifier ses effets et d'élargir son champ d'action. En utilisant la RT-PCR quantitative, réalisée sur les cellules NK purifiés à partir des PBMC de cinq témoins différents, nous avons mis en évidence une expression basale relativement élevée des ARNm codant pour les récepteurs EP2 et EP4, l'expression des ARNm des récepteurs EP1 et EP3 étant indétectable (figure 1A). Par ailleurs, alors que le niveau d'expression d'EP2 est comparable entre les témoins, nous observons une grande variabilité inter-individuelle d'expression basale de l'ARNm d'EP4, avec des niveaux d'expression allant du simple au double selon les sujets sains testés (données non montrées).

Au niveau protéique, l'analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire basale de ces 4 récepteurs confirme l'expression d'EP2 et d'EP4 à la surface des cellules NK au repos (figure 1B). Par contre, en ce qui concerne les récepteurs EP1 et EP3, les résultats de cytométrie en flux sont sujet à caution. En effet, en raison de l'absence d'isotype contrôle disponible pour ces anticorps (polyclonal de lapin non couplé à un fluorochrome), nous avons utilisé comme contrôle l'anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de lapin-FITC). Les résultats obtenus laissent penser qu'il existe une expression de ces deux récepteurs sur les cellules NK, en opposition avec les données obtenues en RT-PCR (figure 1B).

Régulation de l'expression de NKG2D et de CD132 (IL-15R γ) par l'IL-15 et la PGE2 : étude des récepteurs EP impliqués

Dans un premier temps, nous avons confirmé par cytométrie en flux, l'inhibition par la PGE2 de l'expression membranaire de NKG2D et de l'IL-15R γ (CD132) sur les cellules NK de sujets sains. Cette inhibition est observée à partir de 24 heures de culture, pour des concentrations de PGE2 allant de 10 ng/ml à 1 000 ng/ml avec un effet inhibiteur dose-dépendant (données non montrées). La PGE2 étant dissoute dans de l'éthanol, nous avons vérifié l'absence d'effet du diluant sur la viabilité et le phénotype des cellules NK. Pour la suite, nous avons choisi d'étudier à J1 les effets de la PGE2 (35 et 100 ng/ml) sur l'augmentation de l'expression de NKG2D suite à l'activation par l'IL-15 (50 ou 100 ng/ml). Afin de s'affranchir des variabilités interindividuelles, nous avons choisi d'exprimer l'expression de NKG2D en ratio par rapport au milieu seul. Comme montré dans la figure 2A et 2B, l'IL-15 induit de manière significative une forte expression de NKG2D par rapport au milieu et aussi par rapport à la PGE2. Cette augmentation de l'expression de NKG2D est significativement plus prononcée à 50 ng/ml d'IL-15 en comparaison avec la concentration de 100 ng/ml. En plus de son effet inhibiteur sur l'expression basale de NKG2D, la PGE2 empêche de façon significative l'augmentation de l'expression de NKG2D induite par l'IL-15, et ce aussi bien à 35 et à 100 ng/ml.

Par la suite, nous avons voulu déterminer quels sont les récepteurs de la PGE2 impliqué dans ces effets. Nous nous sommes intéressés aux récepteurs EP2 et EP4 et nous avons étudié l'effet de l'agoniste d'EP2: Butaprost et de l'agoniste d'EP4 : CAY-10598. Une mise au point préalable a été nécessaire afin de déterminer les concentrations optimales induisant un effet quantifiable sur les cellules NK (données non montrées). L'agonistes EP2: Butaprost et l'agoniste EP4 : CAY-10598 ont été utilisés à 100 μ M et 100 nM respectivement. Nos résultats montrent que c'est l'agoniste d'EP2 qui reproduit l'effet de la PGE2 et empêche, de manière significative et comparable à la PGE2, l'augmentation de l'expression de NKG2D induite par l'IL-15 (figure 2C). On peut donc conclure que le récepteur EP2 est impliqué dans cet effet.

Parallèlement, nous avons essayé de déterminer quels sont les récepteurs EP impliqués dans la diminution de l'expression de l'IL-15R γ (CD132) sur les cellules NK. Nos résultats montrent qu'à J1, la PGE2 diminue significativement l'expression de l'IL-15R γ (CD132) induite par l'IL-15, et que cet effet est reproductible par l'agonistes d'EP2 et à moindre degré par l'agoniste d'EP4 (figure 2D). Ainsi, sur les cellules NK, la PGE2 semble agir sur ses deux récepteurs

EP2 et EP4 pour s'opposer à l'augmentation de l'IL-15R γ en réponse à l'IL-15. L'effet du récepteur EP2 semble être prépondérant.

Régulation de l'expression des récepteurs EP2 et EP4 par l'IL-15 et la PGE2

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'IL-15 et la PGE2 régulent l'expression des récepteurs EP2 et EP4 au niveau des cellules NK. En Cytométrie en flux, nous avons observé que l'expression du récepteur EP2 est induite de manière significative en présence d'IL-15 après 24h de stimulation ($p = 0,002$; $n = 10$). La PGE2 ne modifie pas le niveau d'expression basal d'EP2, mais empêche par contre de manière significative son induction par l'IL-15 ($p = 0,0012$; $n = 7$) (figure 3A). De façon intéressante, l'utilisation des agonistes d'EP2 et d'EP4 nous a permis de mettre en évidence l'implication du récepteur EP2 dans cette régulation, puisque seule l'agoniste d'EP2 reproduit l'effet de la PGE2. Ainsi, le récepteur EP2 empêche l'induction de sa propre expression par l'IL-15 ($p = 0,0013$; $n = 5$) (figure 3A).

Le profil de régulation de l'expression du récepteur EP4 ressemble à celui d'EP2. En effet, après 24h de stimulation, l'IL-15 induit significativement l'expression du récepteur EP4 ($p = 0,003$; $n = 10$). Par contre la PGE2 diminue le niveau d'expression basale d'EP4 ($p = 0,015$; $n = 8$) et a tendance à s'opposer à l'augmentation induite par l'IL-15 ($p = 0,063$; $n = 7$) (figure 3B). En utilisant les agonistes nous avons observé que seul l'agoniste d'EP2 s'oppose significativement à l'effet de l'IL-15 et empêche l'augmentation de l'expression d'EP4 ($p = 0,012$; $n = 5$) (figure 3B). Le fait que l'agoniste d'EP2 s'oppose de manière plus efficace que la PGE2 à l'effet de l'IL-15 pourrait s'expliquer par la présence d'une compétition entre EP2 et EP4 pour lier la PGE2. De plus la PGE2 a beaucoup plus d'affinité pour le récepteur EP4 que pour EP2. Vu que seul EP2 est impliqué dans cette régulation, l'effet est plus net avec l'agoniste d'EP2.

Globalement, nos résultats montrent que l'IL-15 augmente l'expression des récepteurs EP2 et EP4, et que la PGE2 s'oppose à cet effet. Seul le récepteur EP2 semble être impliqué dans cette régulation.

Production de la PGE2 par les cellules NK

La PGE2 peut exercer ses fonctions par effet autocrine. Cependant, la capacité des cellules NK à produire elle-même de la PGE2 n'est pas documentée. Afin de vérifier ce point, nous avons utilisé la technique ELISA pour doser la PGE2 dans les surnageants de 24h de culture de cellules NK purifiées de témoins, en présence ou en absence d'IL-15, d'agoniste EP2, ou d'agoniste EP4. Nos résultats préliminaires montrent que les cellules NK sont capables de produire de la PGE2, et ce même en absence de stimulation (figure 4). L'IL-15 a un effet inhibiteur sur la sécrétion de la PGE2 par les NK (diminution d'un facteur 3, figure 4). En ce qui concerne les agonistes d'EP2 et d'EP4, ils régulent de manière opposée la production de la PGE2 par les cellules NK : en effet l'agoniste d'EP2 induit fortement la sécrétion de la PGE2 par les cellules NK (augmentation d'un facteur 21, figure 4) et s'oppose à la diminution induite par l'IL-15. Au contraire, l'agoniste d'EP4 a un effet comparable à l'IL-15 et diminue la production de la PGE2 par les cellules NK (diminution d'un facteur 7, figure 4). Ainsi, les cellules NK sont capables de produire de la PGE2. Cette sécrétion semble être régulée négativement par l'IL-15. Il est également possible que la PGE2 participe de manière autocrine à la régulation de sa propre production par les cellules NK, et ce en agissant à travers ses deux récepteurs EP2 et EP4. Cependant, cette régulation semble être complexe puisque l'étude par les agonistes des récepteurs EP2 et EP4 met en évidence des effets opposés de ces récepteurs.

Expression des protéines COX-1 et COX-2

La PGE2 est issue du métabolisme de l'acide arachidonique par des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2. Afin de vérifier la présence d'une régulation en amont de la production de la PGE2 par les cellules NK, et en particulier au niveau des protéines COX-1 et COX-2, nous avons étudié par cytométrie en flux, l'expression intracellulaire des molécules COX-1 et COX-2 au niveau des cellules NK, au repos ou après stimulation avec l'IL-15 ou la PGE2. Aucune de ces conditions ne nous a permis de détecter l'expression de ces molécules. Afin de valider notre technique et de s'assurer qu'il n'existe aucun problème inhérent aux anticorps, nous avons étudié l'expression de COX-1 et COX-2 au niveau de monocytes (isolés par adhérence) stimulés pendant 6 heures par du LPS. Comme montré dans la figure 5, nous avons pu obtenir un marquage spécifique de COX-1 et de COX-2 dans les monocytes stimulés, avec une forte induction de COX-2 et une induction plus modérée de COX-1. Vu le manque de sensibilité de la cytométrie en flux, nous avons par la suite choisi d'étudier par PCR quantitative le niveau

d'expression des transcrits de COX-1 et COX-2 dans les cellules NK. Au repos, les cellules NK présentent un niveau basal de COX-1 assez similaire entre les différents sujets sains. A l'inverse, même si le niveau basal d'expression de COX-2 est comparativement très faible, nous avons observé une grande variabilité interindividuelle (Figure 6A). Nous avons également étudié l'expression de COX-1 et COX-2 après stimulation par l'IL-15, la PGE2, ou les agonistes d'EP2 et d'EP4, seuls ou en différentes combinaisons. Cette étude nous montre qu'aussi bien l'IL-15 que la PGE2 ainsi que leur association diminuent significativement l'expression de l'ARNm de COX-1 (Figure 6B). En revanche l'IL-15 induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de COX-2 (Figure 6C). La PGE2 seule ne semble pas influencer l'expression de COX-2 mais par contre semble s'opposer à l'augmentation induite par l'IL-15 même si le résultat n'est pas encore significatif (Figure 6C). Les agonistes des récepteurs EP2 et EP4 seuls ne semblent pas intervenir dans la régulation de l'expression des transcrits de COX-1 et de COX-2 (Figure 6B et 6C).

L'étude de la régulation de l'expression de COX-1 et de COX-2 au niveau de l'ARNm ne nous permet pas de bien comprendre les résultats obtenus en ELISA. En ce qui concerne l'IL-15, il est possible que l'effet de la diminution de l'expression de COX-1 (ARNm) soit prépondérant et induise au final une diminution globale de la production de la PGE2 objectivé par les tests ELISA. Quant aux récepteurs EP2 et EP4, l'étude par PCR quantitative ne permet pas de mettre en évidence leur participation au niveau de la régulation de l'expression de COX-1 et COX-2.

Discussion

La présence de la PGE2 au niveau du microenvironnement tumoral constitue un facteur favorisant le développement du processus néoplasique, et ce par un effet double. D'une part, la PGE2 constitue un facteur proangiogénique qui supporte la survie et la croissance tumorale. D'autre part, la PGE2 est dotée de fonctions immunosuppressives qui lui permettent de participer à la mise en place d'un microenvironnement tumoral propice pour échapper à la réponse immune de l'hôte [138, 319, 321]. Son rôle immunosuppresseur sur les différentes cellules du système immunitaire est étudié depuis de nombreuses années. Notamment, ses effets sur les lymphocytes T ont été largement décrits [319, 342, 343]. Cependant, il n'existe que peu d'études concernant ses effets sur les cellules NK ainsi que ses effets antagonistes par rapport à d'autres cytokines pro-inflammatoires capables de stimuler les fonctions des cellules NK. Nos résultats confirment les effets antagonistes de la PGE2 et de l'IL-15 au niveau de la cellule NK,

et donnent un premier aperçu sur la complexité de mécanismes par les quelles ces deux facteurs se régulent mutuellement.

La PGE2 est reconnue par 4 récepteurs EP différents. La caractérisation de leur profil d'expression sur les cellules NK humaines a été très peu étudiée. Nos résultats montrent que les cellules NK expriment les récepteurs EP2 et EP4 (concordance entre la PCR quantitative et la cryométrie de Flux), et nos résultats corroborent ceux retrouvés par une autre équipe [326]. Quant à l'expression d'EP3 et EP1, nos résultats discordants entre la PCR quantitative et la cryométrie de Flux ne nous permettent pas de tirer des conclusions claires. Cependant, même si Martinet et al. ont montré une expression d'EP3 sur les NK, ce travail identifie EP2 et EP4 comme étant les deux principaux récepteurs qui supportent les effets de la PGE2 au niveau des cellules NK humaines. En effet, après avoir confirmé qu'au niveau de la cellule NK la PGE2 inhibe l'induction par l'IL-15 de l'expression de NKG2D et de l'IL-15R γ , nous montrons de plus que ces effets passent par l'engagement du récepteur EP2 et à moindre degré par celui d'EP4. Ainsi, l'agoniste EP2 reproduit l'effet de la PGE2 sur l'expression de NKG2D et s'oppose à l'action de l'IL-15. En revanche, aussi bien EP2 qu'EP4 (cependant à moindre degré) inhibent l'effet de l'IL-15 sur l'augmentation de l'expression de l'IL-15R γ au niveau des cellules NK. Afin de mieux comprendre les rapports intriqués entre l'action de l'IL-15 et celle de la PGE2 au niveau des cellules NK, nous avons de plus étudié la régulation de l'expression des récepteurs EP2 et EP4 sous l'influence isolée ou combinée de la PGE2 et de l'IL-15. Globalement, nos résultats montrent que l'IL-15 induit une forte augmentation de l'expression d'EP2 et d'EP4 sur les cellules NK. La PGE2 s'oppose à cette augmentation et cet effet semble engager uniquement son récepteur EP2, puisque seul l'agoniste d'EP2 est capable de le reproduire. Globalement, ces résultats nous permettent déjà d'établir un premier schéma intégrant les effets opposés de la PGE2 et de l'IL-15 dans un même modèle de régulation de la réponse immune NK. L'IL-15 est une cytokine pro-inflammatoire ayant des effets activateurs notoires sur les cellules NK. Elle stimule leur prolifération et favorise leurs capacités cytotoxiques notamment en augmentant l'expression de NKG2D. Ici, nous montrons que simultanément, l'IL-15 induit l'expression de l'IL-15R γ mais également celle des récepteurs à la PGE2 EP2 et EP4. Ainsi, l'IL-15 favorise sa propre action en induisant une plus grande expression de l'IL-15R γ au niveau des cellules NK, mais en même temps, elle prépare le terrain pour une action efficace de la PGE2 et ce en induisant l'expression d'EP2 et EP4. En se fixant sur ses récepteurs, la PGE2 exerce ses effets immunosuppresseurs sur la cellule NK et diminue l'expression de NKG2D et celle de l'IL-15R γ , constituant ainsi un rétrocontrôle négatif

permettant de terminer l'activation induite par l'IL-15. A travers son récepteur EP2, la PGE2 régule sa propre action et diminue l'expression de ses récepteurs EP2 et EP4. Au final, en diminuant l'expression de NKG2D, de l'IL-15R γ et de ses propres récepteurs EP, la PGE2 permet à la cellule NK un retour à l'état « de base » après l'activation induite par l'IL-15.

La PGE2 est synthétisée par de nombreuses cellules immunes et non immunes [83, 144-147]. Cependant, à notre connaissance, sa production par les cellules NK n'a pas été vérifiée. Ici, notre étude préliminaire met en évidence pour la première fois la capacité des cellules NK à produire de la PGE2. En effet, les cellules NK produisent de la PGE2 à l'état basal. L'IL-15 ainsi que l'agoniste EP4, seuls ou en association, semblent inhiber cette production. A l'opposé, la stimulation du récepteur EP2 semble favoriser la sécrétion de la PGE2 par les cellules NK et empêche la diminution induite par l'IL-15. Ces résultats nous indiquent qu'en plus de son effet paracrine, la PGE2 est capable d'exercer un effet autocrine au niveau des cellules NK. Cependant, ces résultats préliminaires ne nous permettent pas de dégager un schéma clair qui permet de comprendre la régulation de la sécrétion de la PGE2 par les cellules NK. L'IL-15 semble l'inhiber mais en même temps elle favorise l'expression du récepteur EP2 qui lui en revanche semble être impliqué dans l'augmentation de la production de la PGE2 par les cellules NK. D'autre part, l'IL-15 induit aussi l'expression du récepteur EP4 au niveau des cellules NK et ce dernier semble avoir un effet agoniste sur leur production de PGE2. Pour mieux clarifier cette régulation et la résultante de tous ces effets, il est nécessaire d'étudier l'effet de la stimulation combinée des récepteurs EP2 et EP4 (en utilisant l'association des agonistes EP2 et EP4) en présence ou en absence de l'IL-15.

La PGE2 est produite à partir de l'acide arachidonique grâce à deux enzymes, COX-1 et COX-2. COX-1 est une enzyme constitutivement exprimée dans de nombreux types cellulaires alors que COX-2 est induite en situation inflammatoire [337]. Il n'existe aucune donnée concernant leur expression dans les cellules NK. Etant donné que les NK sont capables de produire de la PGE2, il n'est pas exclu que cette production soit régulée en amont, au niveau même de COX-1 et COX-2. La Cytométrie de Flux ne semble pas être une technique suffisamment sensible pour pouvoir étudier l'expression des protéines COX au niveau des cellules NK. Par contre, en utilisant la PCR quantitative, nous montrons que les cellules NK expriment un niveau basal de COX-1 assez similaire entre les différents témoins, alors que le niveau basal de COX-2 est très faible, et soumis à une plus grande variabilité inter-individuelle. Nous montrons également que l'IL-15 et la PGE2 diminuent conjointement l'expression de COX-1. Au contraire, l'IL-15 augmente l'expression de COX-2, et la PGE2 semble s'opposer à cet effet. Il est difficile pour

l'instant de faire un parallélisme entre la régulation de l'expression de COX-1 et de COX-2 (au niveau de l'ARNm) et la production de la PGE2 (ELISA) au dans cellules NK. L'IL-15 exerce un effet opposé sur l'expression de COX-1 et COX-2. Une diminution importante de COX-1, même en présence d'une augmentation de COX-2, pourrait conduire au final à une diminution globale de la production de la PGE2 par les cellules NK. De son côté, la PGE2 diminue l'expression de COX-1 et elle est sans effet ou s'oppose à l'augmentation de COX-2 par l'IL-15. Ainsi, au niveau des enzymes COX, la PGE2 semble globalement réguler négativement sa propre production par les cellules NK. Dans ces conditions expérimentales, nous ne sommes pas parvenus à clairement identifier les rôles joués par EP2 et EP4 dans cette régulation. Par ailleurs, il est important de signaler que la PCR quantitative étudie un temps très précoce de la régulation et n'est pas forcément le reflet fidèle de ce qui se passe sur le plan protéique. Il n'est pas exclu de trouver des résultats plus concordants entre PCR quantitative et test ELISA en étudiant la sécrétion de la PGE2 par les cellules NK à des temps plus précoces (6h et 12h de stimulation). Il serait également intéressant d'étudier le profil d'expression des enzymes COX suite à la stimulation concomitante des deux récepteurs EP2 et EP4.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ce travail nous permettent déjà de mieux caractériser le rôle de la PGE2, et son antagonisme avec l'IL-15, dans la régulation de l'activation des cellules NK. Ces résultats suggèrent qu'en situation inflammatoire aiguë, la PGE2 produite par les cellules NK elles-mêmes et/ou par d'autres cellules immunitaires sous l'effet d'une induction de la transcription de COX-2, exercerait un effet régulateur sur l'activation NK induite par l'IL-15 (baisse d'expression du récepteur NKG2D et de l'IL-15R γ). Ce mécanisme évite un emballement de la réponse NK, et participe à la terminaison de cette réponse lors d'un épisode qui doit être rapidement résolutif, tel qu'une infection virale aiguë. Au cours de certains cancers comme le KS, la PGE2 produite en grande quantité par les cellules tumorales, et/ou par les cellules immunitaires, exerce en permanence un rétrocontrôle négatif sur l'activation NK (effet paracrine et autocrine), conduisant à la perte des fonctions effectrices NK et au défaut d'élimination des cellules tumorales. Au cours des immunothérapies anti-tumorales par l'IL-15 exogène, l'effet antagoniste qu'exerce la PGE2 par rapport à l'IL-15 pourraient induire des phénomènes de résistance au traitement. Nous pensons que l'obstacle que représente la PGE2 pourrait alors être contourné par l'administration simultanée d'inhibiteurs de COX2/PGE2. On peut en effet imaginer qu'en absence de rétrocontrôle négatif par la PGE2, des doses d'IL-15 plus faibles et donc moins toxiques pourraient être utilisées.

Cette hypothèse sera vérifiée *in vitro* à l'aide de l'utilisation de différents inhibiteurs de COX2 ou d'antagonistes des récepteurs EP en combinaison avec l'IL-15 et/ou la PGE2. Leur effet sera jugé sur leur capacité à contrecarrer l'antagonisme qu'exerce la PGE2 sur l'activation des cellules NK en réponse à l'IL-15.

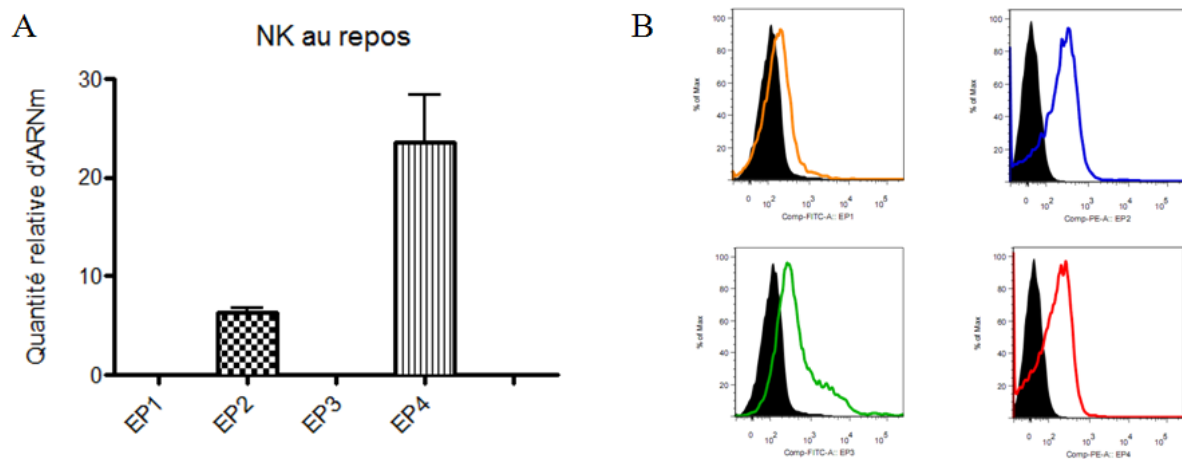


Figure 1: Expression des récepteurs EP2 et EP4 à la surface des cellules NK au repos. (A) Quantification par RT-PCR de l'expression basale des ARNm codant pour EP1, EP2, EP3 et EP4 dans les cellules NK triées. Le graphique montre les moyennes d'expression pour chaque récepteur (normalisées par rapport aux quantités d'ARNm de l'HPRT-1) (n=5). (B) Expression membranaire basale des récepteurs EP1 (en orange), EP2 (en bleu), EP3 (en vert) et EP4 (en rouge) à la surface de cellules NK triées (image représentative de celles obtenues sur 3 témoins sains). L'histogramme en noir correspond à l'isotype contrôle pour EP2 et EP4, et au marquage par l'anticorps secondaire seul pour EP1 et EP3.

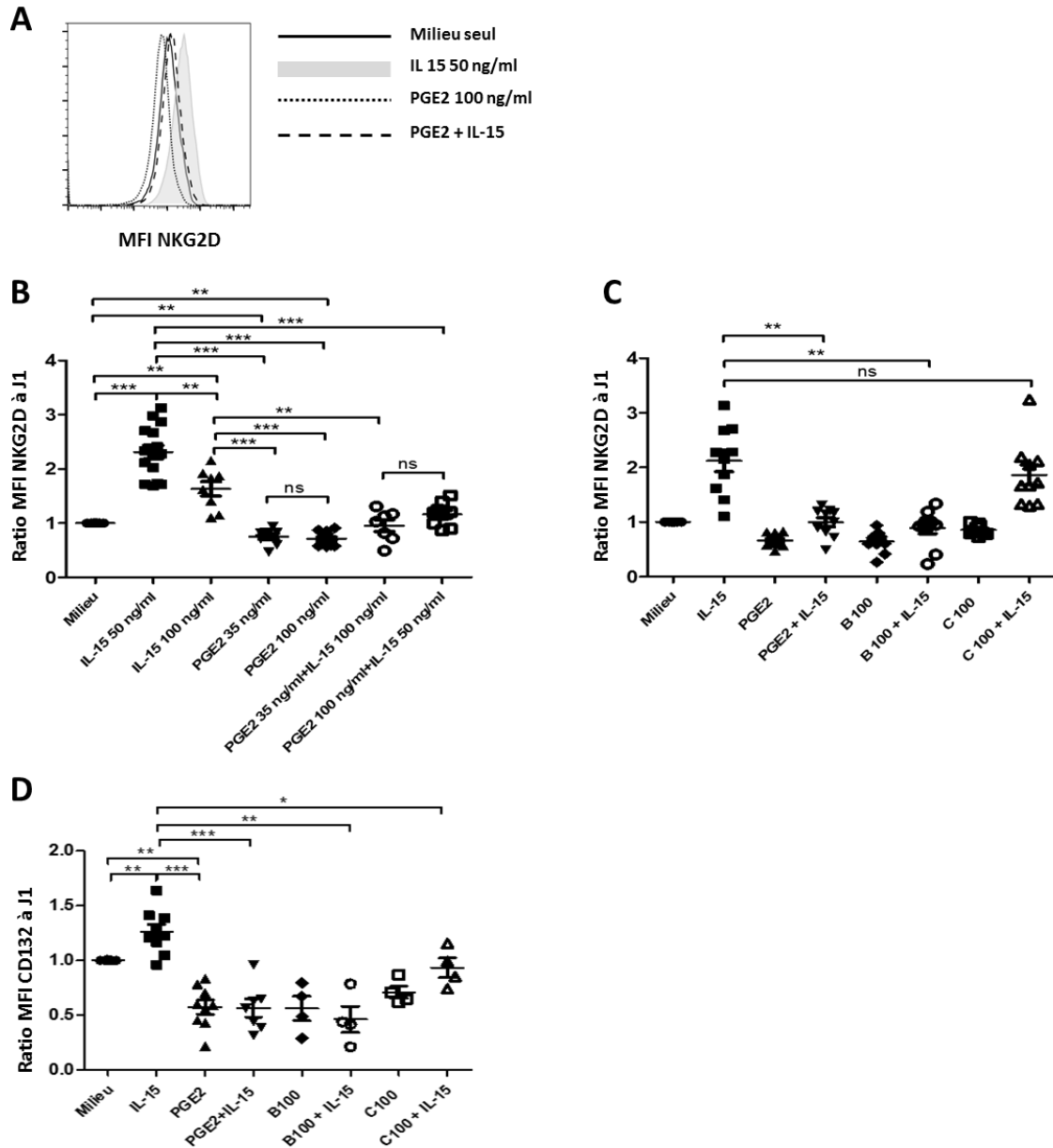


Figure 2. Régulation de l'expression de NKG2D et de CD132 sur les cellules NK par la PGE2 et l'IL-15, et étude des récepteurs EP impliqués. A) Exemple d'histogramme illustrant les influences de l'IL-15 et de la PGE2, seules ou en association, sur l'expression de NKG2D sur les cellules NK d'un témoin sain. B) Graphique résumant l'effet de l'IL-15 et de la PGE2, seules ou en association, sur l'expression de NKG2D sur les cellules NK (n= 7 à 15). C) et D) Etude de l'implication des récepteurs EP2 et EP4 dans les effets de la PGE2 sur l'expression de NKG2D et de CD132 : IL-15 50 ng/ml, PGE2 100 ng/ml, agoniste d'EP2 (Butaprost, 100 μ M B100)), agoniste d'EP4 (CAY-10598, 100 nM C100)) (n= 4 à 10). Les valeurs de p sont indiquées (Mann-Whitney).

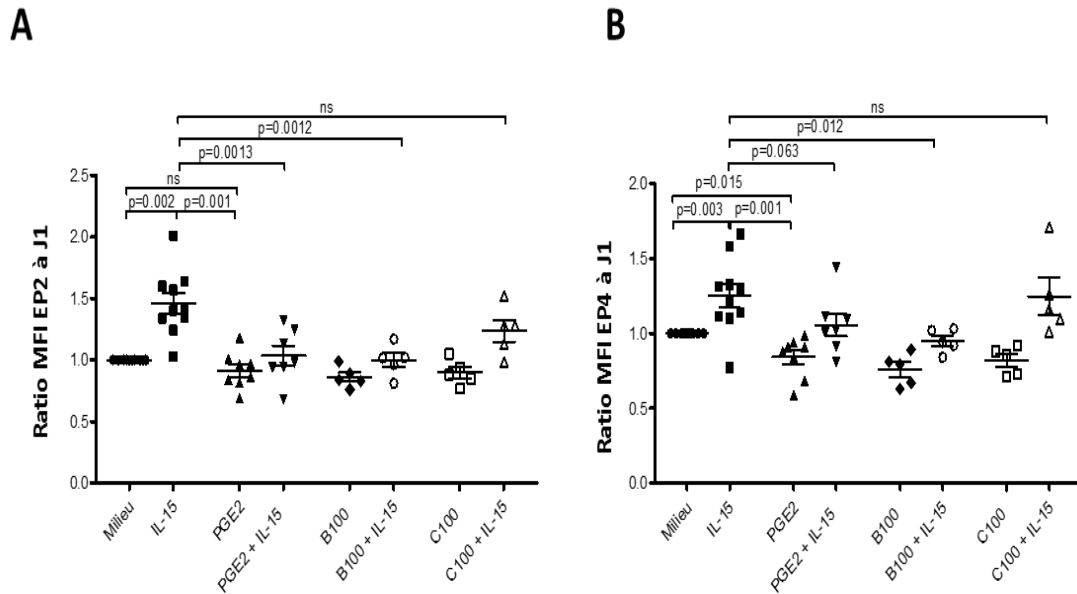


Figure 3. Régulation de l'expression des récepteurs EP2 et EP4 dans les cellules NK. A) et B) Graphiques résumant l'effet de l'IL-15 (50 ng/ml), de la PGE2 (100 ng/ml), de l'agoniste d'EP2 (Butaprost, 100 μ M (B100)) ou de l'agoniste d'EP4 (CAY-10598, 100 nM (C100)), seuls ou en différentes combinaisons, sur l'expression des récepteurs EP2 et EP4 dans les cellules NK (n= 4 à 10 sujets témoins). Les valeurs de p sont indiquées (Mann-Whitney).

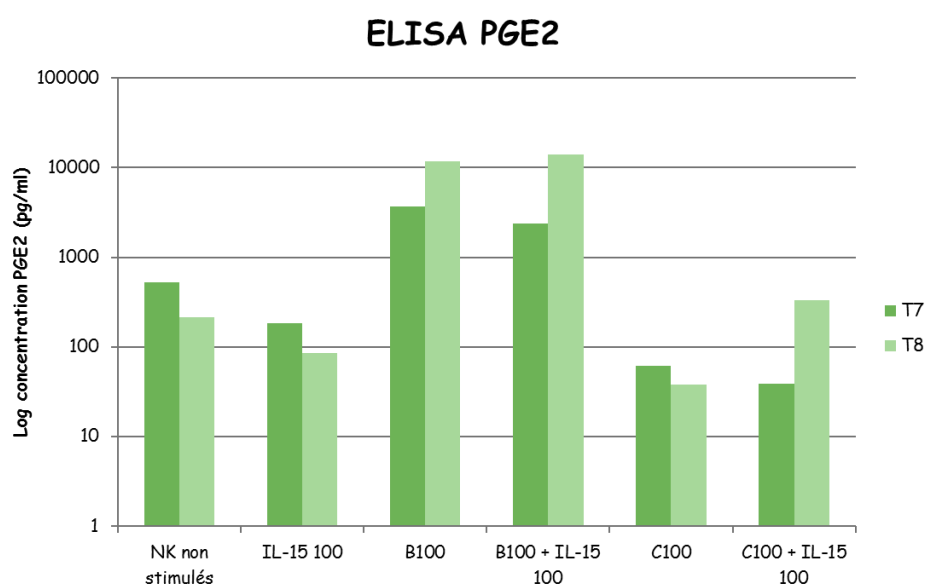


Figure 4. Etude de la production de la PGE2 par les cellules NK. Représentation graphique montrant la production de la PGE2 par les cellules NK purifiées, en présence ou en absence d'IL-15 (50 ng/ml), d'agonistes d'EP (Butaprost, 100 μ M (B100)) ou de d'agoniste d'EP4 (CAY-10598, 100 nM (C100)), seuls ou en combinaisons (n= 2).

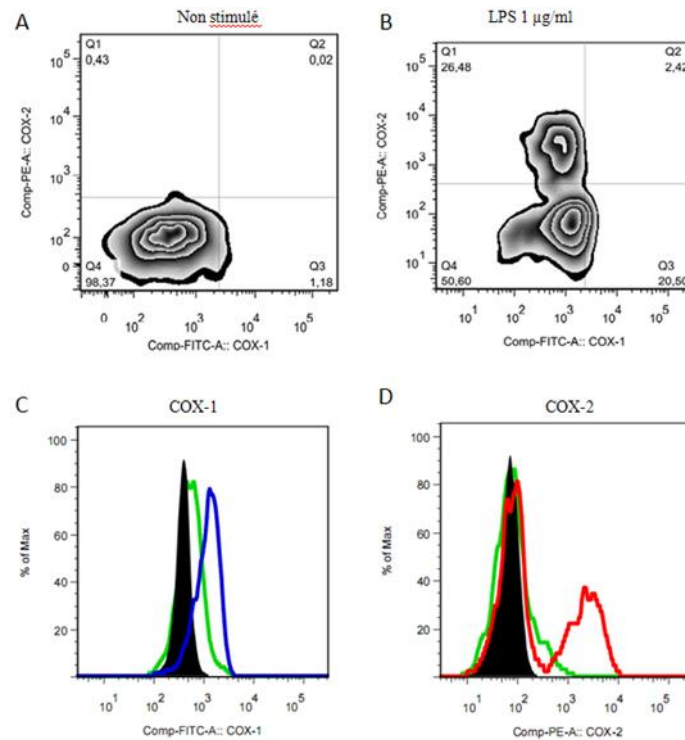


Figure 5: Induction de la synthèse des protéines COX-1 et COX-2 dans les monocytes stimulés par le LPS. Les monocytes d'un témoin sain sont incubés pendant 6 heures en absence (A) ou en présence (B, C et D) de LPS (1 µg/ml) avant d'évaluer l'expression des protéines COX-1 (C) et COX-2 (D). (A) et (B) Monocytes non stimulés (A) ou stimulés (B) pendant 6 heures avec le LPS et marqués avec les anticorps anti-COX-1-FITC/anti-COX-2-PE. (C) et (D) Les histogrammes montrent la variation de la MFI de COX-1 (C, en bleu) et COX-2 (D, en rouge) chez un témoin sain en présence de LPS. L'histogramme en vert correspond à la MFI des monocytes non stimulés et l'histogramme noir correspond à l'isotype contrôle.

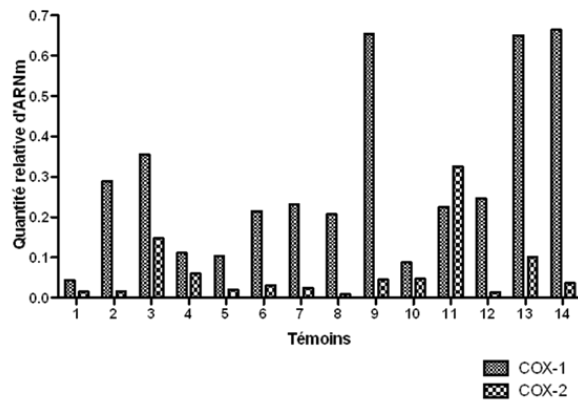
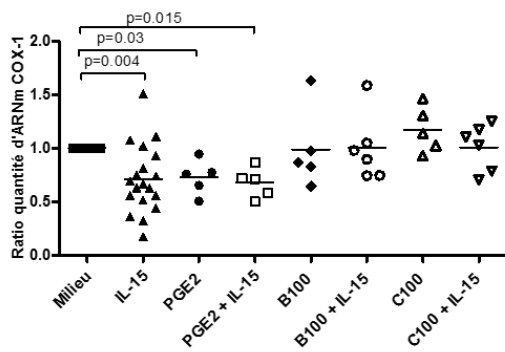
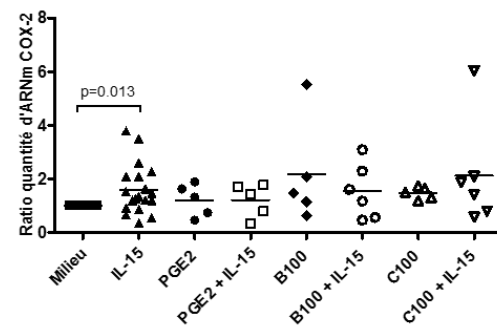
A**B****C**

Figure 6. Régulation de l'expression des enzymes COX-1 et COX-2 par les cellules NK.
 A) Expression basale de COX-1 et COX-2 par les cellules NK de sujets sains. Le graphique représente les quantités relatives d'ARNm de COX-1 et de COX-2, normalisées par rapport à l'HPRT-1, dans les cellules NK au repos, isolées à partir des PBMC de 14 témoins sains (T1 à T14) par tri négatif. B) et C) Etude par PCR quantitative de la régulation de l'expression de COX-1 et COX-2 en réponse à différentes stimulations seules ou en combinaison: IL-15 (50 ng/ml), PGE2 (100 ng/ml), agonistes d'EP2 (Butaprost, 100 μ M (B100)), ou agoniste EP4 (CAY-10598, 100 nM (C100)), (n= 5 à 19). Les valeurs de p sont indiquées (Mann-Whitney).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

Les infections virales chroniques, notamment par les virus HHV8 et VHC, sont caractérisées par une phase aigüe non complètement maîtrisée par le système immunitaire de l'hôte, permettant le passage à la chronicité puis éventuellement à un stade ultérieur, la transformation tumorale dans le cas des virus oncogènes. Les phases aiguës de ces infections sont très peu documentées car elles sont rarement symptomatiques et passent donc souvent inaperçues chez le sujet immunocompétent. Chez l'homme, les mécanismes d'échappement à la réponse immune sont donc essentiellement étudiés à la phase chronique et à la phase de transformation tumorale de ces infections. On peut situer sur le plan chronologique les altérations qui touchent la réponse immune à la phase tumorale par rapport à celles qui sont déjà présentes à la phase chronique de l'infection. Par contre, il est difficile de savoir à partir de quel moment la fonction des cellules immunitaires commence à se détériorer, et si les altérations observées à la phase chronique sont déjà toutes ou en partie présentes à la phase aigüe de l'infection. Cependant, nous savons que les cellules NK se mobilisent rapidement et peuvent donc jouer un rôle clé dans la résolution précoce de l'infection virale. On peut donc supposer qu'au moins quelques mécanismes d'échappement à la réponse NK sont déjà opérationnels à la phase aigüe de l'infection. Leur identification permettrait d'intervenir plus rapidement avec des stratégies thérapeutiques ciblées, et ce afin d'éviter les dommages occasionnés par la chronicisation de l'infection virale.

Notre groupe étudie depuis plusieurs années les mécanismes d'échappement à la réponse immune du virus HHV8. Les résultats de ces travaux montrent qu'une réponse lymphocytaire T CD8 anti-HHV8 peut parfois participer au contrôle de la survenue ou de la progression d'un KS chez les sujets infectés non immunodéprimés [344]. Cependant, le virus HHV8 a développé divers mécanismes d'évasion pour échapper à cette réponse T cytotoxique [345]. En particulier, les protéines virales MIR1 et MIR2 inhibent l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées. Ceci les rend « invisibles » aux lymphocytes T CD8, mais devrait théoriquement les rendre susceptibles à la lyse par les cellules NK. L'activation des cellules NK résulte d'un équilibre dynamique entre différents signaux activateurs et inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires qui reconnaissent des ligands constitutifs ou inductibles à la surface des cellules. En situation physiologique,

l'expression constitutive de molécules HLA de classe I à la surface des cellules saines délivre aux cellules NK des signaux inhibiteurs et empêche leur destruction par les NK. Les modifications phénotypiques des cellules infectées ou tumorales (baisse d'expression des molécules HLA-I et/ou induction de ligands des récepteurs activateurs) seront perçues comme une modification de l'équilibre des signaux inhibiteurs/activateurs, conduisant à l'activation des fonctions effectrices NK et à la destruction des cellules pathologiques. Pour échapper à la reconnaissance NK, les virus oncogènes utilisent donc d'autres mécanismes. Notre groupe a récemment montré que l'une de ces stratégies porte sur la modulation des voies d'activation NKG2D et IL-15 par la prostaglandine E2 (PGE2) d'origine tumorale [83]. De plus, au cours des investigations menées sur la caractérisation des cellules NK de patients infectés par le HHV8, la découverte fortuite de l'expression de PD-1 sur les cellules NK nous a conduit à mettre en évidence un mécanisme supplémentaire d'échappement à la réponse NK en particulier et à la réponse immune de l'hôte d'une manière générale.

Au cours de ce travail, nous nous sommes successivement intéressés à l'étude du récepteur PD-1 et de la molécule PGE2 en tant que deux mécanismes régulateurs impliqués dans l'échappement viral et tumoral à la réponse NK.

PD-1 est une molécule régulatrice exprimée d'une manière transitoire sur les lymphocytes T activés. Cependant, au cours des dernières années, de nombreux travaux ont montré que PD-1 est également exprimé sur cellules les lymphocytes T épuisées («exhausted T cells») par une stimulation antigénique chronique. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, PD-1 a été incriminé dans le dysfonctionnement profond des T CD8 mémoires antiviraux au cours de certaines infections virale chroniques, notamment par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) chez la souris [252], et par le VIH [253-255], le VHB [256, 257] et le VHC [258-260] chez l'homme. De plus, PD-1 est également impliqué dans l'échappement tumoral à la réponse immune de l'hôte et ce en induisant un défaut fonctionnel des lymphocytes T infiltrant la tumeur. La neutralisation in vitro de l'interaction entre PD-1 et ses ligands permet de restaurer les fonctions des lymphocytes T exprimant PD-1, ce qui représente une approche thérapeutique prometteuse. En effet, plusieurs essais cliniques ciblant le blocage de l'axe PD-1/PD-1 ligands commencent à donner des résultats très encourageants dans les pathologies cancéreuses [284, 285].

PD-1 n'est classiquement pas exprimé sur les cellules NK, effecteurs majeurs de l'immunité innée antivirale. Les résultats de notre travail suggèrent que la stimulation persistante des cellules NK peut également induire leur épuisement à travers l'expression de PD-1. De façon comparables aux lymphocytes T, nous montrons ici que PD-1 caractérise une sous population de cellules NK, phénotypiquement matures et activées, fonctionnellement « épuisées », et susceptible à l'apoptose.

Le contexte d'infection virale chronique présente beaucoup de facteurs confondants qui ne nous permettent pas de déterminer si PD-1 est responsable ou bien seulement un marqueur d'épuisement cellulaire NK. Afin de nous affranchir de ces difficultés, nous avons tout d'abord choisi produire des transfectants PD-1 à partir de la lignée NK-92 (IL-2 dépendante, n'exprime pas PD-1 constitutivement), et en utilisant comme technique le système Amaxa. Cette partie a été réalisée en collaboration avec Anne Caignard et Nadège Bercovici (Institut Cochin, Paris) à l'aide d'une construction YFP-PD-1 fournie par Daniel Olive (Institut Paoli Calmettes, Marseille). Malheureusement, les cellules NK, sont difficiles à transfecter et le rendement des transfections était très faible. Nous avons par la suite changé de méthode et utilisé la transduction par le système lentiviral afin de pouvoir obtenir un meilleur résultat et une expression stable de PD-1. Cette partie a été réalisée grâce à notre collaboration avec Claire HIVROZ et Stéphanie DOGNIAUX (Institut Curie), qui ont une grande expertise en ce qui concerne la transduction lentivirale des lymphocytes T. Nous n'avons pas pu obtenir de bon résultats avec la lignée NK92, par contre, l'utilisation de la lignée NKL (IL-2 dépendante, n'exprime pas PD-1 constitutivement) a été avantageuse et nous a permis d'obtenir une expression stable de PD-1 (> à 30 jours). Grâce à cet outil, nous avons pu montrer que l'expression de PD-1 sur les cellules NK induit un défaut fonctionnel, mais par contre n'est pas responsable des altérations phénotypiques observées chez les patients. Les cellules NKL PD-1+ vont par la suite nous permettre d'étudier les conséquences de l'engagement de PD-1 (voire la simple présence de PD-1) sur les voies de signalisations activatrices des cellules NK. Nous souhaitons vérifier notre hypothèse que, dans les cellules NK, l'engagement de PD-1 conduit à la déphosphorylation des molécules de signalisation en aval des récepteurs activateurs. Ultérieurement, nous souhaitons confirmer nos résultats sur des cellules NK primaires transduites avec un vecteur PD-1.

Le récepteur PD-1 a deux ligands : PD-L1 et PD-L2. Contrairement à PD-L2, PD-L1 a une distribution large y compris sur les cellules hématopoïétiques [172]. La plus part des tests fonctionnels que nous avons utilisés ici ne nous renseignent pas sur l'interaction entre PD-1 et

ses ligands. Cependant, étant donné que l'étude fonctionnelle a été réalisée sur des PBMC totaux, nous ne pouvons pas exclure un éventuel engagement de PD-1 par ces ligands, en particulier par PD-L1 vu sa large expression sur les cellules hématopoïétiques. De plus, pour induire ses effets, une faible interaction entre PD-1 et PD-L1 serait suffisante [193]. Afin de pouvoir simuler l'engagement de PD-1 avec son ligand PD-L1, nous avons utilisé le système de cytotoxicité redirigée grâce à la lignée cellulaire P815, en présence ou en absence de la molécule chimérique PD-L1-Fc. Nous n'avons pas observé une majoration de l'inhibition en présence de PD-L1. Dans les cellules NKL PD-1+, nous avons observé une faible expression de PD-L1. Nous ne pouvons donc pas exclure la présence d'interactions homotypiques PD-1/PD-L1 responsable de l'effet inhibiteur observé. *In vivo*, nous avons pu montrer par immunohistochimie l'expression de PD-L1 dans les biopsies issues de lésions de Sarcome de Kaposi (3 biopsies de 3 patients différents) et nous avons également pu la confirmer au niveau des biopsies de foie issues de 5 patients chroniquement infectés par le VHC (figure 19). Ces résultats suggèrent qu'*in vivo*, le récepteur PD-1 sur les cellules NK peut s'engager avec ses ligands et ce au niveau du site même de l'infection virale ou de la lésion tumorale. On peut imaginer que dans ce contexte hautement immunosuppresseur, l'engagement de PD-1 avec ses ligands exerce une forte inhibition sur les cellules NK. Cette inhibition pourrait être maintenue même en dehors du site de l'inflammation quand les cellules NK re-circulent en périphérie. Ce maintien de l'effet de PD-1 pourrait s'expliquer soit par l'entretien de l'engagement de PD-1 avec de faibles interactions avec son ligand PD-L1, soit par l'absence d'un fort signal activateur (telle qu'une forte stimulation par l'IL-2 ou l'IL-15) capable d'inverser et d'annuler l'effet de PD-1 pour lever l'inhibition exercée (ou les deux mécanismes). Cette hypothèse pourrait expliquer nos observations *in vitro* concernant les cellules NK issues du sang périphérique des patients. Nos résultats ne nous permettent donc pas de savoir si l'interaction de PD-1 avec ses ligands est nécessaire pour induire l'inhibition fonctionnelle des cellules NK. Pour élucider ce point, nous réitérerons les tests fonctionnels en présence d'anticorps monoclonaux anti-PD-L1 et anti-PD-L2 bloquant leur interaction avec PD-1. Si ce système permet de rétablir la fonction des cellules NK PD-1+, nous concluons alors que l'engagement de PD-1 avec ses ligands est nécessaire pour induire une inhibition fonctionnelle. Dans le cas contraire, nous ne pourrions pas tirer des conclusions claires étant donné qu'on ne peut pas exclure le fait qu'*in vivo*, une possible interaction soutenue entre PD-1 et ses ligands puisse se produire et induire une inhibition fonctionnelle à effet prolongé. Une autre alternative serait d'utiliser des siRNA ciblant les gènes de PD-L1 et de PD-L2 dans notre lignée NKL PD-1+, ce qui nous permettrait d'étudier sans ambiguïté les conséquences fonctionnelles de l'expression de PD-1.

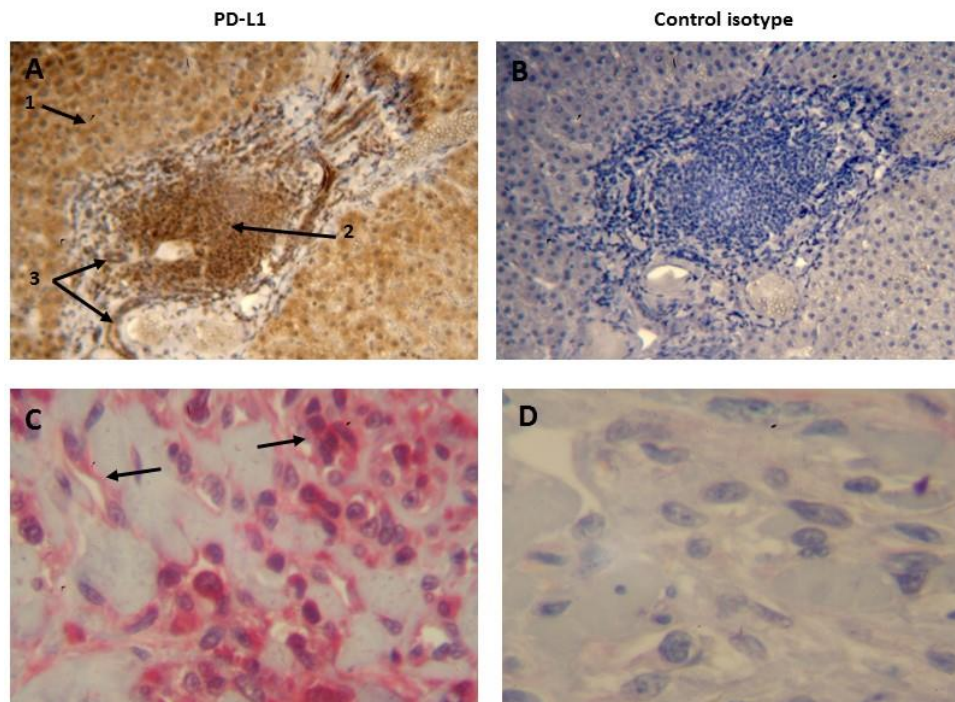


Figure 19. Expression de PD-L1 au niveau des biopsies hépatiques et cutanées de patients HCV+ et KS+ respectivement. Les photos montrent le marquage de PD-L1 (A et C) ou de l'isotype contrôle (B et D) au niveau des coupes de paraffines d'une biopsie de foie chroniquement infecté par le VHC (A et B) et d'une biopsie d'une lésion cutanée de KS (C et D). En A, les flèches montrent l'expression de PD-L1 sur (1) les hépatocytes, (2) les amas lymphoïdes et (3) les canaux biliaires. En (C) les flèches montrent l'expression de PD-L1 sur les cellules fusiformes tumorales. Grossissement x20 (A-B), x40 (C-D).

T-bet est un facteur de transcription qui a la capacité de réprimer l'expression de PD-1 dans les lymphocytes T. L'expression de T-bet est corrélée négativement à l'expression de PD-1. Notre analyse phénotypique montre qu'en *ex-vivo*, une fraction de cellules NK exprimant fortement PD-1 ont une faible expression de T-bet. Ces résultats suggèrent donc que T-bet pourrait participer à la régulation de l'expression de PD-1 dans les cellules NK. Pour confirmer ces résultats, nous allons refaire les expériences d'induction *in vitro* de l'expression de PD-1 sur les cellules NK en analysant en même temps l'évolution de l'expression de T-bet en fonction de celle de PD-1.

En conclusion de cette première partie, nous montrons que PD-1 représente un nouveau mécanisme d'échappement à la réponse immune NK au cours des infections virales chroniques. Nous pensons que dans les cellules NK, l'expression soutenue de PD-1 est induite suite à une exposition prolongée de récepteurs activateurs à leurs ligands qui peuvent être exprimés sur les cellules cibles. Par analogie aux lymphocytes T, l'expression de PD-1 pourrait servir de frein pour éviter un emballement immunitaire des cellules NK à la phase aigüe d'une réponse antivirale. Cependant, les virus utilisent cette faille pour persister. Il serait intéressant de pouvoir étudier l'expression de PD-1 sur les cellules NK chez des patients qui sont en phase aigüe de ces infections. Ceci nous permettrait de comprendre comment les virus réussissent à surmonter la première barrière de la réponse immune antivirale. Mais malheureusement, comme précédemment précisé, les phases aiguës de ces infections sont souvent très peu bruyantes, voir même silencieuses, n'amenant pas les patients à consulter.

En deuxième partie de ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude de la PGE2 en tant que régulateur négatif de l'activation IL-15-dépendante des cellules NK, et à caractériser les interactions complexes qui existent entre ces deux facteurs. Ce projet vient donc compléter et approfondir les données récentes de notre laboratoire.

Mise à part sa capacité à favoriser la croissance tumorale, la PGE2 vient s'ajouter à la liste des facteurs immunosuppresseurs présents dans le microenvironnement tumoral [147]. Elle participe ainsi à affaiblir la réponse immune de l'hôte. La PGE2 est capable d'inhiber les fonctions des cellules NK. Cependant, *in vivo* les cellules NK sont exposées à de nombreux autres facteurs pro-inflammatoires dont l'IL-15, cytokine clé dans l'homéostasie et l'activation des cellules NK. Il est donc essentiel de comprendre comment la cellule NK réagit après l'intégration des différents signaux (en principe opposés) délivrés par l'IL-15 et la PGE2.

Au niveau des cellules NK, la PGE2 exerce un effet antagoniste sur l'augmentation de l'expression de NKG2D et l'IL-15R γ induite par l'IL-15 [83]. Au cours de ce travail nous avons confirmé ce résultat et nous avons de plus montré que ces effets dépendent des récepteurs EP2 et à moindre degré EP4. Nous avons aussi montré que l'expression des récepteurs EP2 et EP4 est régulée de manière opposée par la PGE2 et l'IL-15 : l'IL-15 augmente l'expression de ces récepteurs au niveau des cellules NK alors que la PGE2 la réprime à travers la stimulation de son récepteur EP2. De plus nous avons mis en évidence la production de la PGE2 par les cellules NK (effet autocrine de la PGE2).

Ces résultats préliminaires nous permettent déjà de mieux comprendre la régulation réciproque et complexe qu'exercent la PGE2 et l'IL-15 sur l'activation NK. Schématiquement, l'IL-15 active les cellules NK en induisant l'expression de NKG2D et exerce un rétrocontrôle positif sur sa propre action en induisant l'expression de son récepteur IL-15R γ . En même temps elle favorise l'effet inhibiteur (autocrine et paracrine) de la PGE2 en induisant l'expression de ses récepteurs EP2 et EP4. En retour, la PGE2 exerce un rétrocontrôle négatif sur les effets de l'IL-15 (diminution de l'expression de NKG2D et de l'IL-15R γ) constituant ainsi un garde-fou contre une activation excessive des cellules NK. En fin, la PGE2 diminue aussi l'expression de ses propres récepteurs au niveau des cellules NK permettant ainsi de terminer la réponse NK aux effets de la PGE2 et le retour à l'état basal (figure 20). Il serait intéressant d'étudier *in vitro* la régulation par la PGE2 de l'activation NK dans un système mettant en contact les cellules NK avec une lignée tumorale qui produit de la PGE2 et ce en absence ou en présence de l'IL-15. De plus, l'utilisation de temps de culture cellulaire plus long (6 jours et plus), nous permettrait de mimer et d'analyser les effets induits sur les cellules NK lors d'une exposition prolongée à la PGE2 au cours d'un processus tumoral.

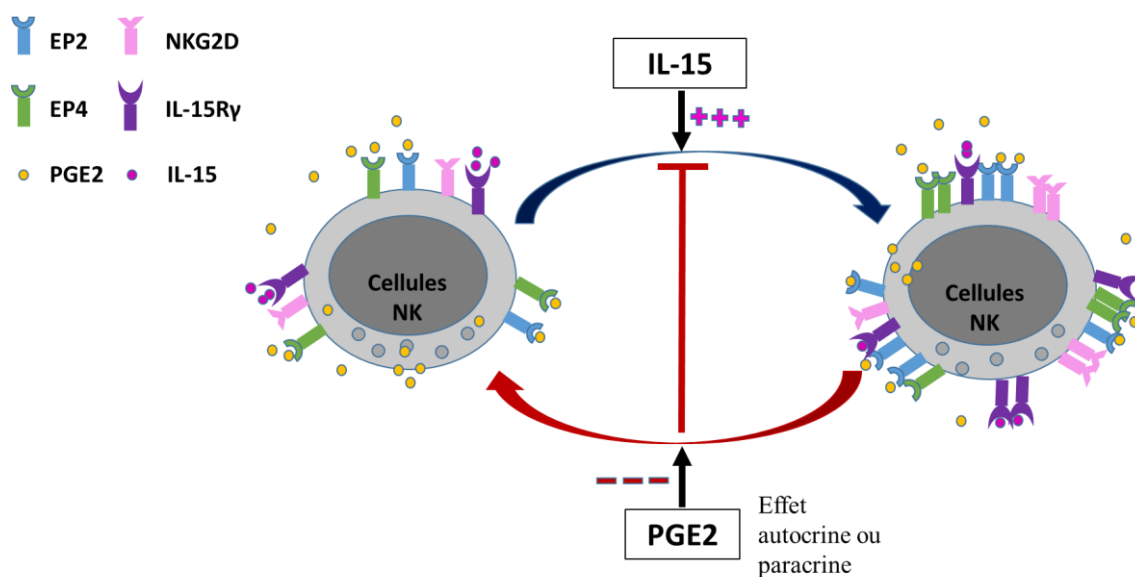


Figure 20. Antagonisme IL-15/PGE2 : régulation de l'activation des cellules NK.

Nous pensons que nos résultats pourraient avoir des retombées scientifiques d'ordre thérapeutique. En effet nos résultats pourraient conduire à modifier les approches actuelles d'immunothérapie anti-tumorale par l'IL-15, en proposant l'administration conjointe d'inhibiteurs de synthèse de PGE2, afin de contrecarrer les effets limitants de la PGE2 sur l'activation NK. En bloquant sélectivement le récepteur EP2 impliqué dans l'effet de la PGE2 sur l'activation NK, il serait même possible d'éviter les effets délétères des inhibiteurs de synthèse globale de COX-2 liés en particulier à la perte de l'effet cardioprotecteur de la PGE2 [346].

Dans la suite de ce projet nous aimerons aussi pouvoir caractériser les voies de signalisation affectées par la PGE2 dans les cellules NK, ainsi que les effets de la PGE2 sur les capacités migratoires des cellules NK. En effet, le rôle des cellules NK dans le contrôle de la progression tumorale est au moins en partie conditionné à leur capacité à migrer vers le site tumoral sous l'effet de chémokines. In vitro, la PGE2 inhibe l'expression de CCR7 induite par l'IL-18, et inhibe la réponse migratoire des cellules NK à CCL21, le ligand de CCR7 [347]. De plus, la PGE2 diminue la production de CXCL10, CCL19 et CCL5 par les DC, suggérant que les DC maturées en présence de PGE2 ont une moindre capacité à recruter les cellules NK via CXCR3, CCR7, CCR1 et/ou CCR5 [328].

En conclusion, ce travail apporte de nouvelles notions concernant les mécanismes d'échappement viral et tumoral à la réponse NK. Nous pensons que PD-1 et PGE2 constituent des mécanismes régulateurs ayant pour but d'atténuer la réponse immune NK une fois l'épisode infectieux aigu endigué. Cependant, dans un contexte inflammatoire chronique, cet effet bénéfique est perdu puisque le frein inhibiteur est maintenu en permanence permettant la pérennisation de l'agression virale ou tumorale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kiessling, R., et al., "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 1975. **5**(2): p. 117-21.
2. Herberman, R.B., et al., Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*, 1975. **16**(2): p. 230-9.
3. Ferlazzo, G. and B. Morandi, Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 159.
4. Gasteiger, G., et al., IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med*, 2013. **210**(6): p. 1167-78.
5. Moffett, A. and F. Colucci, Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*, 2014. **124**(5): p. 1872-9.
6. Villard, J., The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J Innate Immun*, 2011. **3**(4): p. 395-402.
7. Tsigotis, P.D., I.B. Resnick, and M.Y. Shapira, The role of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Med*, 2012. **44**(2): p. 130-45.
8. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, Human natural killer cell development. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 56-72.
9. Yu, J., A.G. Freud, and M.A. Caligiuri, Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*, 2013. **34**(12): p. 573-82.
10. Bercovici, N. and A. Caignard, [The controversial memory of natural killer cells?]. *Med Sci (Paris)*, 2009. **25**(6-7): p. 559-62.
11. Paust, S. and U.H. von Andrian, Natural killer cell memory. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 500-8.
12. Min-Oo, G., et al., Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol*, 2013. **34**(6): p. 251-8.
13. Freud, A.G., et al., Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, 2006. **203**(4): p. 1033-43.
14. Grzywacz, B., et al., Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood*, 2006. **108**(12): p. 3824-33.
15. Perussia, B., Y. Chen, and M.J. Loza, Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol Immunol*, 2005. **42**(4): p. 385-95.
16. Freud, A.G., et al., A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 295-304.
17. Yu, H., et al., Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*, 1998. **92**(10): p. 3647-57.
18. Mrozek, E., P. Anderson, and M.A. Caligiuri, Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996. **87**(7): p. 2632-40.
19. Kennedy, M.K., et al., Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*, 2000. **191**(5): p. 771-80.
20. Lodolce, J.P., et al., IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, 1998. **9**(5): p. 669-76.
21. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
22. Cooper, M.A., et al., Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
23. Jacobs, R., et al., CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(10): p. 3121-7.

24. Messaoudene, M., et al., *Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma*. Cancer Res, 2014. **74**(1): p. 81-92.
25. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
26. Ferlazzo, G. and C. Munz, *NK cell compartments and their activation by dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1333-9.
27. Matos, M.E., et al., *Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1079-84.
28. Jacobs, R., et al., *CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3239-44.
29. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
30. Huntington, N.D., et al., *IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 25-34.
31. Beziat, V., et al., *CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6753-61.
32. Loza, M.J. and B. Perussia, *The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 88-96.
33. Marcus, A. and D.H. Raulet, *Evidence for natural killer cell memory*. Curr Biol, 2013. **23**(17): p. R817-20.
34. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
35. Romee, R., et al., *Cytokine activation induces human memory-like NK cells*. Blood, 2012. **120**(24): p. 4751-60.
36. Seaman, W.E., et al., *beta-Estradiol reduces natural killer cells in mice*. J Immunol, 1978. **121**(6): p. 2193-8.
37. Kumar, V., et al., *Natural killer cells in mice treated with 89strontium: normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration*. J Immunol, 1979. **123**(4): p. 1832-8.
38. Lanier, L.L., H. Spits, and J.H. Phillips, *The developmental relationship between NK cells and T cells*. Immunol Today, 1992. **13**(10): p. 392-5.
39. Spits, H., et al., *Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells*. Immunol Rev, 1998. **165**: p. 75-86.
40. Beecher, M.S., et al., *Expression of the zeta protein subunit in CD3- NK effectors derived from human thymus*. Cell Immunol, 1994. **155**(2): p. 508-16.
41. Binstadt, B.A., et al., *Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 629-38.
42. Burshtyn, D.N. and E.O. Long, *Regulation through inhibitory receptors: Lessons from natural killer cells*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(12): p. 473-9.
43. Campbell, K.S., et al., *Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 93-100.
44. Long, E.O., et al., *Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158)*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 223-33.
45. Yusa, S. and K.S. Campbell, *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4539-47.
46. Lanier, L.L., et al., *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells*. Nature, 1998. **391**(6668): p. 703-7.
47. Olcese, L., et al., *Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5083-6.
48. Karre, K., *Natural killer cell recognition of missing self*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 477-80.

49. Sivori, S., et al., *TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When?* Front Immunol, 2014. **5**: p. 105.
50. Sivori, S., et al., *A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2.* Blood, 2010. **116**(10): p. 1637-47.
51. Brooks, A.G., et al., *NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor.* J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 795-800.
52. Carretero, M., et al., *The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules.* Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 563-7.
53. Lazetic, S., et al., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits.* J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4741-5.
54. Borrego, F., et al., *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.* J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 813-8.
55. Braud, V., E.Y. Jones, and A. McMichael, *The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9.* Eur J Immunol, 1997. **27**(5): p. 1164-9.
56. Braud, V.M., et al., *TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide.* Curr Biol, 1998. **8**(1): p. 1-10.
57. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
58. Lee, N., et al., *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5199-204.
59. Llano, M., et al., *HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer.* Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2854-63.
60. Lanier, L.L., et al., *Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors.* Immunity, 1998. **8**(6): p. 693-701.
61. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 495-502.
62. Borges, L., et al., *A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules.* J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5192-6.
63. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.* J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1809-18.
64. Cosman, D., et al., *A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules.* Immunity, 1997. **7**(2): p. 273-82.
65. Fanger, N.A., et al., *The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes.* Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3423-34.
66. Prod'homme, V., et al., *The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4473-81.
67. Brandt, C.S., et al., *The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans.* J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1495-503.
68. Pogge von Strandmann, E., et al., *Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells.* Immunity, 2007. **27**(6): p. 965-74.
69. Baychelier, F., et al., *Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44.* Blood, 2013. **122**(17): p. 2935-42.
70. Brusilovsky, M., et al., *Human NK cell recognition of target cells in the prism of natural cytotoxicity receptors and their ligands.* J Immunotoxicol, 2012. **9**(3): p. 267-74.
71. Jarahian, M., et al., *Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin.* PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002195.

72. Rosental, B., et al., *Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 5693-702.
73. Sivori, S., et al., *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1656-66.
74. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 197-223.
75. Arnon, T.I., et al., *Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30*. Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2680-9.
76. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
77. Magri, G., et al., *NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies*. Blood, 2011. **117**(3): p. 848-56.
78. Jarahian, M., et al., *Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 8108-21.
79. Sennepin, A., et al., *NKp44L expression on CD4+ T cells is associated with impaired immunological recovery in HIV-infected patients under highly active antiretroviral therapy*. AIDS, 2013. **27**(12): p. 1857-66.
80. Li, S.S., et al., *The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(4): p. 387-97.
81. Esin, S., et al., *Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria*. Infect Immun, 2008. **76**(4): p. 1719-27.
82. Bialoszewska, A., et al., *Constitutive expression of ligand for natural killer cell NKp44 receptor (NKp44L) by normal human articular chondrocytes*. Cell Immunol, 2013. **285**(1-2): p. 6-9.
83. Dupuy, S., et al., *Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma*. PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002486.
84. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
85. de Menthon, M., et al., *Excessive interleukin-15 transpresentation endows NKG2D+CD4+ T cells with innate-like capacity to lyse vascular endothelium in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's)*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(7): p. 2116-26.
86. Eagle, R.A. and J. Trowsdale, *Promiscuity and the single receptor: NKG2D*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 737-44.
87. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10*. Science, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
88. Rosen, D.B., et al., *A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2470-8.
89. Lee, J.C., et al., *Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7335-40.
90. Sene, D., et al., *Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. e1001184.
91. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
92. Pende, D., et al., *Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2030-6.
93. Lam, R.A., et al., *Regulation of self-ligands for activating natural killer cell receptors*. Ann Med, 2013. **45**(4): p. 384-94.

94. Kirkham, C.L. and J.R. Carlyle, *Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 214.
95. Rosen, D.B., et al., *Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6508-17.
96. Boles, K.S., et al., *Molecular characterization of a novel human natural killer cell receptor homologous to mouse 2B4*. Tissue Antigens, 1999. **54**(1): p. 27-34.
97. Mathew, P.A., et al., *Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells*. J Immunol, 1993. **151**(10): p. 5328-37.
98. Munitz, A., et al., *2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 110-8.
99. Brown, M.H., et al., *2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2083-90.
100. Elias, S., et al., *Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia*. Blood, 2014. **123**(10): p. 1535-43.
101. Tangye, S.G., et al., *2B4-mediated activation of human natural killer cells*. Mol Immunol, 2000. **37**(9): p. 493-501.
102. Chuang, S.S., et al., *2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness*. Immunology, 2000. **100**(3): p. 378-83.
103. Mathew, S.O., et al., *Mutational analysis of the human 2B4 (CD244)/CD48 interaction: Lys68 and Glu70 in the V domain of 2B4 are critical for CD48 binding and functional activation of NK cells*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1005-13.
104. Welte, S., et al., *Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1334-42.
105. Colucci, F., J.P. Di Santo, and P.J. Leibson, *Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons?* Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 807-13.
106. Karre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. Nature, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
107. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
108. Markel, G., et al., *The mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1770-8.
109. Valiante, N.M., et al., *Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 739-51.
110. Anfossi, N., et al., *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 331-42.
111. Fernandez, N.C., et al., *A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4416-23.
112. Liao, N.S., et al., *MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity*. Science, 1991. **253**(5016): p. 199-202.
113. Jonsson, A.H. and W.M. Yokoyama, *Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms*. Adv Immunol, 2009. **101**: p. 27-79.
114. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
115. Yokoyama, W.M. and S. Kim, *How do natural killer cells find self to achieve tolerance?* Immunity, 2006. **24**(3): p. 249-57.
116. Yokoyama, W.M. and S. Kim, *Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 143-54.
117. Raulet, D.H. and R.E. Vance, *Self-tolerance of natural killer cells*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 520-31.

118. Gasser, S. and D.H. Raulet, *Activation and self-tolerance of natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 130-42.
119. Brodin, P., K. Karre, and P. Hoglund, *NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat*. Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 143-9.
120. Joncker, N.T., et al., *NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4572-80.
121. Jonsson, A.H., et al., *Effects of MHC class I alleles on licensing of Ly49A+ NK cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3424-32.
122. Mace, E.M., et al., *Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(3): p. 245-55.
123. Topham, N.J. and E.W. Hewitt, *Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?* Immunology, 2009. **128**(1): p. 7-15.
124. Screpanti, V., et al., *A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2068-73.
125. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
126. Somersalo, K., O. Carpen, and E. Saksela, *Stimulated natural killer cells secrete factors with chemotactic activity, including NAP-1/IL-8, which supports VLA-4- and VLA-5-mediated migration of T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 2957-65.
127. Nieto, M., et al., *Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3330-9.
128. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
129. Deniz, G., et al., *Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 850-7.
130. Morandi, B., et al., *NK cells provide helper signal for CD8+ T cells by inducing the expression of membrane-bound IL-15 on DCs*. Int Immunol, 2009. **21**(5): p. 599-606.
131. Vitale, M., et al., *NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the Nkp30 triggering receptor*. Blood, 2005. **106**(2): p. 566-71.
132. Ferlazzo, G., et al., *Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 343-51.
133. Dao, T., et al., *Natural killer cells license dendritic cell cross-presentation of B lymphoma cell--associated antigens*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8763-72.
134. Kerdiles, Y., S. Ugolini, and E. Vivier, *T cell regulation of natural killer cells*. J Exp Med, 2013. **210**(6): p. 1065-8.
135. Brosens, I.A., W.B. Robertson, and H.G. Dixon, *The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia*. J Pathol, 1970. **101**(4): p. Pvi.
136. Voron, T., et al., *Control of the immune response by pro-angiogenic factors*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 70.
137. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6735-41.
138. Kamiyama, M., et al., *EP2, a receptor for PGE2, regulates tumor angiogenesis through direct effects on endothelial cell motility and survival*. Oncogene, 2006. **25**(53): p. 7019-28.
139. Li, H., et al., *Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 240-9.
140. Castriconi, R., et al., *Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4120-5.
141. Ghiringhelli, F., et al., *Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 919-29.

142. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
143. Smyth, M.J., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1582-7.
144. Fogel-Petrovic, M., et al., *Activated human dendritic cells express inducible cyclo-oxygenase and synthesize prostaglandin E2 but not prostaglandin D2*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 47-54.
145. Phipps, R.P., S.H. Stein, and R.L. Roper, *A new view of prostaglandin E regulation of the immune response*. Immunol Today, 1991. **12**(10): p. 349-52.
146. Mahic, M., et al., *FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 246-54.
147. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nature reviews. Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-93.
148. Serrano, A.E., et al., *Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(3): p. 447-57.
149. Chretien, A.S., et al., *Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 122.
150. Cohen, G.B., et al., *The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 661-71.
151. Cerboni, C., et al., *Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 242-50.
152. De Maria, A., et al., *The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44)*. Eur J Immunol, 2003. **33**(9): p. 2410-8.
153. Mavilio, D., et al., *Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15011-6.
154. Mavilio, D., et al., *Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2339-50.
155. Vieillard, V., J.L. Strominger, and P. Debre, *NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10981-6.
156. Tobon, G.J., J.H. Izquierdo, and C.A. Canas, *B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus*. Autoimmune diseases, 2013. **2013**: p. 827254.
157. Mackay, I.R., *Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity*. BMJ, 2000. **321**(7253): p. 93-6.
158. Stuart, R.W. and M.K. Racke, *Targeting T cell costimulation in autoimmune disease*. Expert opinion on therapeutic targets, 2002. **6**(3): p. 275-89.
159. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*, in *The EMBO journal*. 1992. p. 3887-95.
160. Shinohara, T., et al., *Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1)*. Genomics, 1994. **23**(3): p. 704-6.
161. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
162. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
163. Finger, L.R., et al., *The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors*. Gene, 1997. **197**(1-2): p. 177-87.

164. Shlapatska, L.M., et al., *CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A*. *Journal of immunology*, 2001. **166**(9): p. 5480-7.
165. Zhang, X., et al., *Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1*. *Immunity*, 2004. **20**(3): p. 337-47.
166. Yu, C., et al., *Rigid-body ligand recognition drives cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) receptor triggering*. *The Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(8): p. 6685-96.
167. Nishimura, H., T. Honjo, and N. Minato, *Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice*. *The Journal of experimental medicine*, 2000. **191**(5): p. 891-8.
168. Nishimura, H., et al., *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes*. *International immunology*, 1996. **8**(5): p. 773-80.
169. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. *International immunology*, 1996. **8**(5): p. 765-72.
170. Bennett, F., et al., *Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses*. *Journal of immunology*, 2003. **170**(2): p. 711-8.
171. Chemnitz, J.M., et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. *Journal of immunology*, 2004. **173**(2): p. 945-54.
172. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. *Annual review of immunology*, 2008. **26**: p. 677-704.
173. Kinter, A.L., et al., *The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands*. *Journal of immunology*, 2008. **181**(10): p. 6738-46.
174. Thibult, M.L., et al., *PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation*. *International immunology*, 2013. **25**(2): p. 129-37.
175. Ma, C.J., et al., *PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis C virus infection*. *Immunology*, 2011. **132**(3): p. 421-31.
176. Yao, S., et al., *PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection*. *Blood*, 2009. **113**(23): p. 5811-8.
177. Park, S.J., et al., *Negative role of inducible PD-1 on survival of activated dendritic cells*. *Journal of leukocyte biology*, 2014. **95**(4): p. 621-9.
178. Moll, M., et al., *Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection*. *European journal of immunology*, 2009. **39**(3): p. 902-11.
179. Kronig, H., et al., *Interferon-induced programmed death-ligand 1 (PD-L1/B7-H1) expression increases on human acute myeloid leukemia blast cells during treatment*. *European journal of haematology*, 2014. **92**(3): p. 195-203.
180. Oestreich, K.J., et al., *NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation*. *Journal of immunology*, 2008. **181**(7): p. 4832-9.
181. Austin, J.W., et al., *STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF Regulate PD-1 through Multiple Novel Regulatory Regions in Murine T Cells*. *Journal of immunology*, 2014. **192**(10): p. 4876-86.
182. Terawaki, S., et al., *IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity*. *Journal of immunology*, 2011. **186**(5): p. 2772-9.
183. Lu, P., et al., *Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection*. *The Journal of experimental medicine*, 2014. **211**(3): p. 515-27.

184. Kao, C., et al., *Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection*. Nature immunology, 2011. **12**(7): p. 663-71.
185. Mathieu, M., et al., *Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation*. Immunology and cell biology, 2013. **91**(1): p. 82-8.
186. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nature medicine, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
187. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
188. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nature immunology, 2001. **2**(3): p. 261-8.
189. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(7): p. 839-46.
190. Schreiner, B., et al., *Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis*. Journal of neuroimmunology, 2004. **155**(1-2): p. 172-82.
191. Wang, S.F., et al., *Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors*. PloS one, 2011. **6**(3): p. e17621.
192. Messal, N., et al., *PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function*. Molecular immunology, 2011. **48**(15-16): p. 2214-9.
193. Cheng, X., et al., *Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor*. The Journal of biological chemistry, 2013. **288**(17): p. 11771-85.
194. Ghiotto, M., et al., *PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1*. International immunology, 2010. **22**(8): p. 651-60.
195. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
196. Butte, M.J., et al., *Interaction of human PD-L1 and B7-1*. Molecular immunology, 2008. **45**(13): p. 3567-72.
197. Franceschini, D., et al., *PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(3): p. 551-64.
198. Zhang, Y., et al., *Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(31): p. 11695-700.
199. Liu, X., et al., *B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(12): p. 1721-30.
200. Shin, T., et al., *Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(1): p. 31-8.
201. Wang, S., et al., *Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(9): p. 1083-91.
202. Xiao, Y., et al., *RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance*. The Journal of experimental medicine, 2014. **211**(5): p. 943-59.
203. Lin, D.Y., et al., *The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(8): p. 3011-6.
204. Martin-Orozco, N., et al., *Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens*. Journal of immunology, 2006. **177**(12): p. 8291-5.

205. Keir, M.E., et al., *Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(4): p. 883-95.
206. Matsumoto, K., et al., *B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism*. Journal of immunology, 2004. **172**(4): p. 2530-41.
207. Akbari, O., et al., *PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions*. Mucosal immunology, 2010. **3**(1): p. 81-91.
208. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. International immunology, 2007. **19**(7): p. 813-24.
209. Okazaki, T., et al., *PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(24): p. 13866-71.
210. Yokosuka, T., et al., *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(6): p. 1201-17.
211. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
212. Sheppard, K.A., et al., *PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta*. FEBS letters, 2004. **574**(1-3): p. 37-41.
213. Patsoukis, N., et al., *PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2*. Molecular and cellular biology, 2013. **33**(16): p. 3091-8.
214. Chikuma, S., et al., *PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo*. Journal of immunology, 2009. **182**(11): p. 6682-9.
215. Patsoukis, N., et al., *Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation*. Science signaling, 2012. **5**(230): p. ra46.
216. Nurieva, R., et al., *T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals*. The EMBO journal, 2006. **25**(11): p. 2623-33.
217. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
218. Pearce, E.L., et al., *Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1041-3.
219. Sullivan, B.M., et al., *Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(26): p. 15818-23.
220. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
221. Fife, B.T., et al., *Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal*. Nature immunology, 2009. **10**(11): p. 1185-92.
222. Zinselmeyer, B.H., et al., *PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis*. The Journal of experimental medicine, 2013. **210**(4): p. 757-74.
223. Wei, F., et al., *Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(27): p. E2480-9.
224. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunological reviews, 2010. **236**: p. 219-42.
225. Riley, J.L., *PD-1 signaling in primary T cells*. Immunological reviews, 2009. **229**(1): p. 114-25.
226. Zhang, Y., et al., *Cross-talk between programmed death-1 and suppressor of cytokine signaling-1 in inhibition of IL-12 production by monocytes/macrophages in hepatitis C virus infection*. Journal of immunology, 2011. **186**(5): p. 3093-103.

227. Iwai, Y., et al., *PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(1): p. 39-50.
228. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(19): p. 12293-7.
229. Okazaki, T., et al., *A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application*. Nature immunology, 2013. **14**(12): p. 1212-8.
230. Blank, C., et al., *Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells*. Journal of immunology, 2003. **171**(9): p. 4574-81.
231. Zucchelli, S., et al., *Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 385-96.
232. Probst, H.C., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. Nature immunology, 2005. **6**(3): p. 280-6.
233. Keir, M.E., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues*. Journal of immunology, 2007. **179**(8): p. 5064-70.
234. Dilek, N., et al., *Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells*. PloS one, 2013. **8**(12): p. e83139.
235. Francisco, L.M., et al., *PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells*. The Journal of experimental medicine, 2009. **206**(13): p. 3015-29.
236. Okazaki, T., et al., *PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice*. The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(2): p. 395-407.
237. Good-Jacobson, K.L., et al., *PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells*. Nature immunology, 2010. **11**(6): p. 535-42.
238. Kawamoto, S., et al., *The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut*. Science, 2012. **336**(6080): p. 485-9.
239. Cheng, X., et al., *Interaction of programmed death-1 and programmed death-1 ligand-1 contributes to testicular immune privilege*. Transplantation, 2009. **87**(12): p. 1778-86.
240. Guleria, I., et al., *A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance*. The Journal of experimental medicine, 2005. **202**(2): p. 231-7.
241. Wang, J., et al., *Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type 1 diabetes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(33): p. 11823-8.
242. Salama, A.D., et al., *Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(1): p. 71-8.
243. Raptopoulou, A.P., et al., *The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis*. Arthritis and rheumatism, 2010. **62**(7): p. 1870-80.
244. Prokunina, L., et al., *The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis*. Arthritis and rheumatism, 2004. **50**(1): p. 327-8.
245. Kong, E.K., et al., *A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese*. Arthritis and rheumatism, 2005. **52**(4): p. 1058-62.
246. Kroner, A., et al., *A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis*. Annals of neurology, 2005. **58**(1): p. 50-7.
247. Lee, S.H., et al., *Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population*. Arthritis research & therapy, 2006. **8**(6): p. R163.
248. Nielsen, C., et al., *Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes*. Tissue antigens, 2003. **62**(6): p. 492-7.

249. Kristjansdottir, H., et al., *Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis and rheumatism, 2010. **62**(6): p. 1702-11.
250. Kobayashi, M., et al., *Enhanced expression of programmed death-1 (PD-1)/PD-L1 in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome*. The Journal of rheumatology, 2005. **32**(11): p. 2156-63.
251. Matak, N., et al., *Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases*. The American journal of gastroenterology, 2007. **102**(2): p. 302-12.
252. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
253. Petrovas, C., et al., *PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(10): p. 2281-92.
254. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
255. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. Nature medicine, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
256. Boettler, T., et al., *Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection*. Journal of virology, 2006. **80**(7): p. 3532-40.
257. Boni, C., et al., *Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection*. Journal of virology, 2007. **81**(8): p. 4215-25.
258. Golden-Mason, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction*. Journal of virology, 2007. **81**(17): p. 9249-58.
259. Radziejewicz, H., et al., *Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression*. Journal of virology, 2007. **81**(6): p. 2545-53.
260. Penna, A., et al., *Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 588-601.
261. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nature immunology, 2011. **12**(6): p. 492-9.
262. Trautmann, L., N. Chomont, and R.P. Sekaly, *[Inhibition of the PD-1 pathway restores the effector function of HIV-specific T cells]*. Medecine sciences : M/S, 2007. **23**(1): p. 24-5.
263. Porichis, F., et al., *Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade*. Blood, 2011. **118**(4): p. 965-74.
264. D'Souza, M., et al., *Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction*. Journal of immunology, 2007. **179**(3): p. 1979-87.
265. Nicholas, K.J., et al., *B cell responses to HIV antigen are a potent correlate of viremia in HIV-1 infection and improve with PD-1 blockade*. PloS one, 2013. **8**(12): p. e84185.
266. Freeman, G.J., et al., *Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(10): p. 2223-7.
267. Fiscaro, P., et al., *Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 682-93, 693 e1-4.
268. Nakamoto, N., et al., *Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization*. Gastroenterology, 2008. **134**(7): p. 1927-37, 1937 e1-2.
269. Nakamoto, N., et al., *Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade*. PLoS pathogens, 2009. **5**(2): p. e1000313.
270. Youngblood, B., et al., *Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells*. Journal of immunology, 2013. **191**(2): p. 540-4.

271. Thompson, R.H., et al., *Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up*. Cancer research, 2006. **66**(7): p. 3381-5.
272. Ohigashi, Y., et al., *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2005. **11**(8): p. 2947-53.
273. Wu, C., et al., *Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance*. Acta histochemica, 2006. **108**(1): p. 19-24.
274. Nakanishi, J., et al., *Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2007. **56**(8): p. 1173-82.
275. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
276. Chapon, M., et al., *Progressive upregulation of PD-1 in primary and metastatic melanomas associated with blunted TCR signaling in infiltrating T lymphocytes*. The Journal of investigative dermatology, 2011. **131**(6): p. 1300-7.
277. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.
278. Zhang, Y., et al., *Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer*. Cellular & molecular immunology, 2010. **7**(5): p. 389-95.
279. Matsuzaki, J., et al., *Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(17): p. 7875-80.
280. Badoual, C., et al., *PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer*. Cancer research, 2013. **73**(1): p. 128-38.
281. Saito, H., et al., *Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer*. Journal of surgical oncology, 2013. **107**(5): p. 517-22.
282. Badoual, C., et al., *[PD-1 and PDL-1 expression in cancer: significance and prognostic value]*. Medecine sciences : M/S, 2013. **29**(6-7): p. 570-2.
283. Sheridan, C., *Cautious optimism surrounds early clinical data for PD-1 blocker*. Nature biotechnology, 2012. **30**(8): p. 729-30.
284. Topalian, S.L., et al., *Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2014. **32**(10): p. 1020-30.
285. Hamid, O., et al., *Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma*. The New England journal of medicine, 2013. **369**(2): p. 134-44.
286. Orr, M.T. and L.L. Lanier, *Natural killer cell education and tolerance*. Cell, 2010. **142**(6): p. 847-56.
287. Narni-Mancinelli, E., S. Ugolini, and E. Vivier, *Tuning the threshold of natural killer cell responses*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 53-8.
288. Lodoen, M.B. and L.L. Lanier, *Natural killer cells as an initial defense against pathogens*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 391-8.
289. Lisnic, V.J., A. Krmpotic, and S. Jonjic, *Modulation of natural killer cell activity by viruses*. Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(4): p. 530-9.
290. Seidel, E., A. Glasner, and O. Mandelboim, *Virus-mediated inhibition of natural cytotoxicity receptor recognition*. Cell Mol Life Sci, 2012.
291. Chang, W.S., et al., *Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6707-10.
292. Wherry, E.J., et al., *Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 670-84.

293. Zhang, J.Y., et al., *PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors*. *Blood*, 2007. **109**(11): p. 4671-8.
294. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. *The New England journal of medicine*, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
295. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. *The New England journal of medicine*, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
296. Golden-Mason, L., et al., *Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences*. *J Immunol*, 2008. **180**(6): p. 3637-41.
297. Alvarez, I.B., et al., *Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 2010. **202**(4): p. 524-32.
298. Wiesmayr, S., et al., *Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLD*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(2): p. 541-50.
299. Said, E.A., et al., *Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection*. *Nature medicine*, 2010. **16**(4): p. 452-9.
300. Lopez-Verges, S., et al., *CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset*. *Blood*, 2010. **116**(19): p. 3865-74.
301. Lopez-Verges, S., et al., *Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(36): p. 14725-32.
302. Robbins, S.H., et al., *Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2585-9.
303. Wang, J.M., et al., *KLRG1 negatively regulates natural killer cell functions through the Akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection*. *J Virol*, 2013. **87**(21): p. 11626-36.
304. Guma, M., et al., *Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3664-71.
305. Hue, S., et al., *Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 1909-17.
306. Fuller, M.J., et al., *Immunotherapy of chronic hepatitis C virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (PD-1)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. **110**(37): p. 15001-6.
307. Terme, M., et al., *IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer*. *Cancer Res*, 2011. **71**(16): p. 5393-9.
308. Chen, Y., et al., *Programmed death (PD)-1-deficient mice are extremely sensitive to murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(7): p. e1001347.
309. Terme, M., et al., *Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells*. *Cancer Res*, 2012. **72**(11): p. 2757-67.
310. Benson, D.M., Jr., et al., *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody*. *Blood*, 2010. **116**(13): p. 2286-94.
311. Enk, J. and O. Mandelboim, *The role of natural cytotoxicity receptors in various pathologies: emphasis on type I diabetes*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 4.
312. Chisholm, S.E. and H.T. Reyburn, *Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors*. *J Virol*, 2006. **80**(5): p. 2225-33.
313. Garg, A., et al., *Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor*. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 6192-8.
314. Kim, M., et al., *Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes*. *J Immunol*, 2012. **188**(9): p. 4158-70.

315. Townsend, M.J., et al., *T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 477-94.
316. Gill, S., et al., *Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells*. Blood, 2012. **119**(24): p. 5758-68.
317. Youngblood, B., et al., *Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 400-12.
318. Quigley, M., et al., *Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF*. Nat Med, 2010. **16**(10): p. 1147-51.
319. Harris, S.G., et al., *Prostaglandins as modulators of immunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 144-50.
320. Harris, S.G., et al., *Prostaglandins as modulators of immunity*. Trends in immunology, 2002. **23**(3): p. 144-50.
321. Kalinski, P., *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. Journal of immunology, 2012. **188**(1): p. 21-8.
322. Sharma-Walia, N., et al., *Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV) induced COX-2: a key factor in latency, inflammation, angiogenesis, cell survival and invasion*. PLoS pathogens, 2010. **6**(2): p. e1000777.
323. Fujino, H., W. Xu, and J.W. Regan, *Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(14): p. 12151-6.
324. Hata, A.N. and R.M. Breyer, *Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation*. Pharmacol Ther, 2004. **103**(2): p. 147-66.
325. Goto, T., et al., *Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity*. Journal of immunology, 1983. **130**(3): p. 1350-5.
326. Martinet, L., et al., *PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling*. Biochemical pharmacology, 2010. **80**(6): p. 838-45.
327. Walker, W. and D. Rotondo, *Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis*. Immunology, 2004. **111**(3): p. 298-305.
328. Van Elsen, C.H., et al., *Inflammation-restraining effects of prostaglandin E2 on natural killer-dendritic cell (NK-DC) interaction are imprinted during DC maturation*. Blood, 2011. **118**(9): p. 2473-82.
329. Joshi, P.C., et al., *Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common gamma-chain*. Journal of immunology, 2001. **166**(2): p. 885-91.
330. Sreeramkumar, V., M. Fresno, and N. Cuesta, *Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes?* Immunol Cell Biol, 2012. **90**(6): p. 579-86.
331. Dupuy, S., et al., *Human Herpesvirus 8 (HHV8) Sequentially Shapes the NK Cell Repertoire during the Course of Asymptomatic Infection and Kaposi Sarcoma*. PLoS pathogens, 2012. **8**(1): p. e1002486.
332. Mamessier, E., et al., *Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition*. Cancer research, 2011. **71**(21): p. 6621-32.
333. Horng, T., J.S. Bezbradica, and R. Medzhitov, *NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway*. Nature immunology, 2007. **8**(12): p. 1345-52.
334. Milella, M., et al., *CD16 cross-linking induces both secretory and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cytosolic phospholipase A2 (PLA2) activity in human natural killer cells: involvement of ERK, but not PLA2, in CD16-triggered granule exocytosis*. Journal of immunology, 1997. **158**(7): p. 3148-54.

335. Tang, F., et al., *Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15*. The Journal of experimental medicine, 2009. **206**(3): p. 707-19.
336. Tilley, S.L., T.M. Coffman, and B.H. Koller, *Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes*. J Clin Invest, 2001. **108**(1): p. 15-23.
337. Gualde, N. and H. Harizi, *Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(4): p. 353-60.
338. Sugimoto, Y., S. Narumiya, and A. Ichikawa, *Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice*. Prog Lipid Res, 2000. **39**(4): p. 289-314.
339. Harris, R.E., *Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*. Inflammopharmacology, 2009. **17**(2): p. 55-67.
340. Ma, X., et al., *A prostaglandin E (PGE) receptor EP4 antagonist protects natural killer cells from PGE-mediated immunosuppression and inhibits breast cancer metastasis*. Oncoimmunology, 2013. **2**(1): p. e22647.
341. Mao, Y., et al., *Inhibition of tumor-derived prostaglandin-E2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity*. Clin Cancer Res, 2014.
342. Coulombe, F., et al., *Targeted prostaglandin E2 inhibition enhances antiviral immunity through induction of type I interferon and apoptosis in macrophages*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 554-68.
343. Okano, M., et al., *E prostanoid 2 (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T-cell responses by prostaglandin E2*. Immunology, 2006. **118**(3): p. 343-52.
344. Lambert, M., et al., *Differences in the frequency and function of HHV8-specific CD8 T cells between asymptomatic HHV8 infection and Kaposi sarcoma*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3871-80.
345. Coscoy, L., *Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 391-401.
346. Batlouni, M., *[Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects]*. Arq Bras Cardiol, 2010. **94**(4): p. 556-63.
347. Mailliard, R.B., et al., *IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 941-53.